

**UNTERSUCHUNG DER FÄHIGKEIT  
ZUR PRODUKTION VON INTERLEUKIN 2  
BEI HÜHNERN DER UM-B19-LINIE**

**FRIEDERIKE PISCHETSRIEDER**

Disbui. München

1989







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554801\\_0104](https://archive.org/details/IA41554801_0104)

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und  
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

angefertigt unter Leitung von  
Prof. Dr. Uli Lösch

UNTERSUCHUNG DER FÄHIGKEIT ZUR PRODUKTION VON  
INTERLEUKIN 2  
BEI HÖHNERN DER UM-B19-LINIE

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

von  
Friederike Pischetsrieder  
aus Haag

1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse  
Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Lösch  
Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

## INHALTSVERZEICHNIS

|       |                                                                        |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung und Literatur                                               | 1  |
| 1.1   | Interleukin 2                                                          | 1  |
| 1.1.1 | Interleukin 2 beim Säuger                                              | 1  |
| 1.1.2 | Interleukin 2 beim Haushuhn                                            | 17 |
| 1.2   | Die UM-B19-Linie                                                       | 20 |
| 2     | Aufgabenstellung                                                       | 24 |
| 3     | Material und Methoden                                                  | 26 |
| 3.1   | Tiermaterial                                                           | 26 |
| 3.1.1 | UM-B19-Hühner                                                          | 26 |
| 3.1.2 | Kontrolltiere                                                          | 26 |
| 3.2   | Lymphozytengewinnung                                                   | 27 |
| 3.2.1 | Blutentnahme                                                           | 27 |
| 3.2.2 | Trennung der Lymphozyten                                               | 27 |
| 3.2.3 | Zellzählung                                                            | 27 |
| 3.3   | Zellkultur                                                             | 28 |
| 3.3.1 | Kulturmedium                                                           | 28 |
| 3.3.2 | Kultuvierung der Zellen                                                | 28 |
| 3.4   | Mitogene Stimulation der Zellen                                        | 28 |
| 3.4.1 | Überstand Concanavalin A-stimulierter<br>Lymphozyten (Con A-Überstand) | 29 |
| 3.4.2 | Testzellen für den Interleukin 2-Test                                  | 29 |
| 3.4.3 | Kontrollüberstand                                                      | 30 |

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| 3.5   | Bestimmung der Interleukin 2-Aktivität  | 30 |
| 3.5.1 | Ansatz der Mikrotiterplatte             | 30 |
| 3.5.2 | $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau           | 31 |
| 3.5.3 | Ernte der Zellen                        | 31 |
| 3.5.4 | Ermittlung des radioaktiven Einbaus     | 31 |
| 3.6   | Absorptionsversuch                      | 31 |
| 3.7   | Auswertung der Ergebnisse               | 32 |
| 4     | Ergebnisse                              | 34 |
| 4.1   | Etablierung des Interleukin 2-Tests     | 34 |
| 4.2   | Stimulation von PBL mit Con A           | 34 |
| 4.3   | Wirkung der Con A-Überstände            | 37 |
| 4.4   | UM-B19-Tiere als Spender von Testzellen | 41 |
| 4.5   | Absorptionen                            | 42 |
| 5     | Diskussion                              | 43 |
| 6     | Zusammenfassung                         | 50 |
| 7     | Literatur                               | 52 |

# 1            Einleitung und Literatur

## 1.1           Interleukin 2

### 1.1.1          Interleukin 2 beim Säuger

Die Mechanismen, die die Regulation des Immunsystems bewerkstelligen, sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

Schon lange ist bekannt, daß sich das Immunsystem in zwei funktionell und in ihrer Herkunft unterschiedliche Untersysteme aufspaltet, die allerdings eng zusammenarbeiten: Das humorale System, dessen Zellen in der Bursa Fabricii (beim Vogel) oder im Bursaäquivalent (beim Säuger) heranreifen, und das zelluläre System, dessen Zellen aus dem Thymus kommen. Je nach ihrer Herkunft nennt man die Zellen B-Zellen (bursaabhängig) bzw. T-Zellen (thymusabhängig).

Die B-Zellen produzieren Antikörper (Immunglobuline), die freigesetzt werden und als freie Antikörper im Blut, im Interstitium, aber auch in allen Körperhöhlen agieren können.

Die T-Zellen spalten sich in mindestens drei Untergruppen auf: T-Effektorzellen, T-Helferzellen und T-Suppressorzellen. Die drei Zellarten haben sehr unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen.

T-Helferzellen aktivieren die T-Effektorzellen, nachdem sie mit einem Antigen in Kontakt gekommen sind. Außer auf die T-Effektorzellen wirken sie aber auch noch auf B-Zellen und sogar auf nicht lymphozytäre Zellen wie

Makrophagen. Dazu produzieren und sezernieren die T-Helferzellen sogenannte Lymphokine.

T-Suppressorzellen unterdrücken die Funktionen anderer Lymphozyten und verhindern so andauernde und überschießende Reaktionen des Immunsystems.

Die T-Effektorzellen (zytotoxische T-Lymphozyten, ZTL) schließlich vernichten fremde oder virusinfizierte Zellen. Deren Oberflächen tragen Antigene, die nicht oder nicht nur körpereigen sind. Dazu gehören z.T. auch Tumorzellen, die Oberflächenantigene exprimieren, die von den T-Zellen als "fremd" erkannt werden. Das setzt voraus, daß die T-Zellen die nicht körpereigenen Zellen erkennen. Zur Erkennung der Antigene tragen die T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche T-Zell-Antigen-Rezeptoren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren erkennen die T-Effektorzellen Oberflächenantigene der fremden Zelle und lysieren diese anschließend.

Damit diese Reaktion überhaupt in Gang kommt, und damit genügend zytotoxische Zellen zur Vernichtung größerer Mengen von Fremdzellen vorhanden sind, müssen verschiedene Reaktionen ablaufen (s. Abb. 1):

"Ein Antigen/Lektin interagiert mit den spezifischen Rezeptoren auf Zellklonen ruhender Vorformen der zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL-V) [1]. Diese Interaktion treibt die Zellen von der  $G_0$ - in die  $G_1$ -Phase des Zellzyklus (Kristensen et al., 1981) und zur Expression von Rezeptoren für IL 2 [2]. Sobald die antigenspezifische Induktion der Expression der IL 2-Rezeptoren beendet ist, ist die Präsenz des Antigens nicht mehr notwendig. IL 2 steuert nun konzentrationsabhängig die klonale Expansion und funktionelle Differenzierung all jener ZTL-V-Klone,

die durch Antigen/Lektin spezifisch sensibilisiert wurden [3].

In Analogie zur Aktivierung von ZTL-Vorläuferzellen durch Antigen/Lektin und Interleukin 2 werden T-Helferzellen ebenfalls durch die Wirkung zweier distinkter Signale aktiviert: Das Antigen/Lektin, welches durch die 'akzessorischen' Zellen (Makrophagen) den T-Helferzellen präsentiert wird, stellt Signal 1 dar [4] und das Makrophagenprodukt Interleukin 1 das Signal 2 [5]. Eine der Effektorleistungen aktivierter T-Helferzellen besteht dann in der Produktion von Interleukin 2 [6]." (aus Solbach et al., 1983)

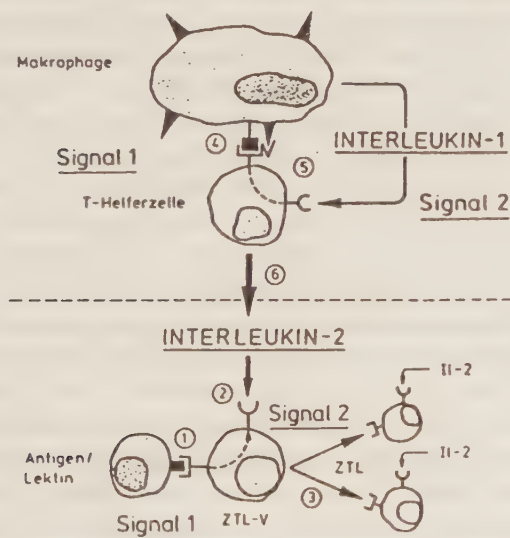


Abb. 1 Aktivierung von T-Zellen (aus Solbach et al., 1983)

Eine reife T-Effektorzelle ist in der Lage, nacheinander mehrere fremde oder virustragende Körperzellen zu lysieren, ohne selbst Schaden zu nehmen. Nachdem sie sich an die Zelle angeheftet hat, scheint sie einen Stoff freizusetzen, der die Zellmembran innerhalb von zehn bis 15 Minuten rupturiert. Die Reste der getöteten Zellen werden anschließend von Freßzellen beseitigt.

Im Falle einer Infektion müssen jedoch in kurzer Zeit möglichst viele Effektorzellen zur Verfügung stehen. Die antigenstimulierten T-Zellen erhalten deshalb den Befehl, sich zu vermehren. Der Botenstoff ist hierbei Interleukin 2 (= T Cell Growth Factor, TCGF), das von T-Helferzellen produziert wird. Fehlt allerdings Interleukin 1, z.B. weil die Makrophagen aus der Kultur entfernt wurden, bleibt die anschließende Interleukin 2-Synthese aus (Farr et al., 1977; Smith et al., 1979; Larsson et al., 1980).

Nachdem sie mit einem Antigen Kontakt gehabt haben, exprimieren die T-Effektorzellen einen Rezeptor für Interleukin 2. Nur wenn Interleukin 2 auf diesen Rezeptor trifft, ist das für die Zelle das Signal, sich zu teilen. Anderenfalls bleibt sie als Gedächtniszelle liegen, um gegebenenfalls bei erneutem Kontakt mit dem selben Antigen zur Verfügung zu stehen. Weil auch die T-Helferzelle nur nach Antigenkontakt Interleukin 2 produziert, ist gewährleistet, daß die Reaktion zum Stillstand kommt, wenn alles Antigen vernichtet ist. Dann fehlt der T-Helferzelle der Stimulus zur Produktion von Interleukin 2 und die ZTL-Vorläufer exprimieren den Rezeptor nicht.

Die Höhe der Proliferationsrate der T-Effektorzellen und

die Dauer der Reaktion hängen nur von der Menge des zur Verfügung stehenden IL 2 und der Anzahl der rezeptortragenden aktivierten T-Zellen ab.

Als Stimulantien kommen außer "echten" Antigenen auch Stoffe wie Phytohämagglutinin (PHA) oder Concanavalin A (Con A) in Frage, die ebenfalls auf T-Zellen mitogen wirken. Reine B-Zellaktivatoren wie die Lipopolysaccharide (LPS) sind dagegen wirkungslos (Grönvick und Andersson, 1980; Larsson und Coutinho, 1980).

Außer Interleukin 2 sezernieren die T-Helferzellen noch verschiedene andere Lymphokine, z.B. den Migration Inhibiting Factor (MIF), B-Cell Differentiation Factor (BCDF) und B-Cell Growth Factor (BCGF), die beiden Interleukine, die - ähnlich wie Interleukin 1 und 2 die T-Lymphozyten - die B-Zellen zur Differenzierung und Proliferation anregen. Somit übernehmen die T-Helferzellen die wichtigsten Funktionen bei der Regulation des Immunsystems.

Alle Lymphokine sind - ähnlich wie die Hormone - Botenstoffe, meist Proteine, die antigenunabhängig auf alle Zellen wirken, die Rezeptoren für sie exprimieren.

Um die geschilderten Vorgänge aufzudecken, waren jahrelange intensive Forschungsarbeiten notwendig.

Bereits in den siebziger Jahren war bekannt, daß B-Zellen in vitro nur dann zur Synthese von Antikörpern fähig sind, wenn sie zusammen mit T-Zellen kultiviert werden (Claman et al., 1966; Mitchell und Miller, 1968). Nur kurze Zeit später erkannte man, daß die T-Zellen

durch Überstände von T-Zellkulturen ersetzt werden können (Dutton et al., 1971; Schimpl und Wecker, 1972), bzw. durch Produkte der T-Helferzellen in der Kultur. Folgerichtig bezeichnete man diese Helferzellprodukte als "T-cell replacing factor" (TRF) (Schimpl und Wecker, 1972). Gewonnen wurde TRF aus Kulturüberständen von polyklonal stimulierten T-Zellkulturen. Später stellte sich heraus, daß ähnlich wie die B-Zellen auch zytotoxische T-Zellen von einem T-Helferzellprodukt in der Kultur abhängig sind (Bach et al., 1973; Wagner et al., 1973). Man ging davon aus, daß ein lösliches Produkt der antigenstimulierten T-Helferzellen die Aktivierung von Vorläuferzellen der zytotoxischen T-Lymphozyten bewirkt oder zumindest verstärkt. Der lösliche Faktor sei wohl antigenunspezifisch, also bei allen Zellen der gleiche (Wagner et al., 1973). Dafür sprach, daß Interleukin 2, das von Con A-stimulierten T-Zellen stammt, auch auf Zellen wirkt, die mit anderen Antigenen Kontakt hatten (Pfizenmaier et al., 1980). Die Überprüfung von Wagners Vermutung war aber erst möglich, als es gelang, die einzelnen Subpopulationen der T-Lymphozyten an Hand ihrer Oberflächenantigene auseinanderzuhalten bzw. einzelne Subpopulationen aus der Kultur zu entfernen (Cantor und Boyse, 1975). Weitere Versuche bewiesen dann endgültig, daß T-Helferzellen nötig sind, um antigenstimulierte T-Effektorzellen zur Proliferation zu veranlassen (Cantor und Simpson, 1975; Cantor und Boyse, 1975). Darüber hinaus sind für die Differenzierung der ZTL-Vorläufer in T-Effektorzellen Makrophagen wichtig (Wagner und Röllinghoff, 1978; Andersson et al., 1979; Grönvick und Andersson, 1980; Larsson et al., 1980). Der Effekt von T-Helferzellen ist auch dann zu beobachten, wenn man

statt der Zellen Kulturüberstände von antigen- oder lektinstimulierten T-Zellkulturen verwendet, in denen T-Helferzellen vorhanden waren. Überstände von Zellkulturen, in denen ausschließlich zytotoxische Lymphozyten enthalten waren, sind dagegen wirkungslos (Wagner und Röllinghoff, 1978).

Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus wurde schließlich nachgewiesen, daß der T-Helfereffekt auf ein Lymphokin zurückzuführen ist. Die wichtigste Bedeutung des T-Helferfaktors lag in seiner Fähigkeit, T-Zellkulturen über längere Zeit zu exponentiellem Wachstum anzuregen, ohne daß diese Kulturen dabei ihre spezifischen Fähigkeiten - fremde Zellen zu lysieren - verloren (Ruscetti et al., 1977; Gillis et al., 1978).

Ursprünglich gab jede der parallel arbeitenden Forschungsgruppen den entdeckten Lymphokinen einen eigenen Namen. So kam es, daß ein und dasselbe Lymphokin TRF (T-cell replacing factor), SCIF (secondary cytotoxic T lymphocytes inducing factor), TMF (thymocyte mitogenic factor) oder TCGF (T-cell growth factor) genannt wurde. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur einigte man sich darauf, alle löslichen Mediatoren, die die Funktionen der Leukozyten regulieren, als "Interleukine" zu bezeichnen (Aarden et al, 1979). TCDF (T-cell differentiation factor) wurde Interleukin 1, TCGF nannte man Interleukin 2. Die Abkürzung ist IL 1 und IL 2.

Tatsächlich zeigten TCGF, TRF, Costimulator etc. fast ausschließlich Gemeinsamkeiten: Sie alle steigerten die Mitogenese aktivierter Thymozyten ganz erheblich. Thymo-

zyten eignen sich hervorragend, um die Wirkung von IL 2 zu beweisen, weil sie normalerweise kaum T-Helferzellen enthalten und deshalb nur schlecht auf die Zugabe von Antigenen oder anderen Stimulantien ansprechen (Cantor und Boyse, 1977). Alle Faktoren waren in den Versuchen in der Lage, T-Helferzellen bzw. deren Funktion zu ersetzen und zytotoxische T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen; allerdings nur dann, wenn gleichzeitig ein Antigen angeboten wurde.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die mitogene Wirkung des Supernatants völlig verschwindet, wenn Proteasen zugesetzt werden, versuchte man eine Reihe von Reinigungsschritten, wie sie in der Proteinanalytik üblich sind: Chromatographien (mit Molekularsiebgelen) und Nachweismethoden wie Immunelektrophorese, isoelektrische Fokussierung (IEF), sowie Sedimentationsanalyse zur Molekulargewichtsbestimmung. Das erhaltene Protein zeigte zwischen den isoelektrischen Punkten 3,8 und 4,8 ähnliche Aktivität zeigt.

1980 faßte Paetkau mit seinen Mitarbeitern in einem Artikel zusammen, was bis dahin über IL 2, das von verschiedenen Zellen gewonnen worden war, bekannt war:

Tab. 1 Eigenschaften von IL 2, produziert von verschiedenen Zellen. (aus Paetkau et al., 1980)

Table 1. Molecular Properties of IL-2<sup>a, b</sup>

| Property                               | Mouse         |         | Human         |              |              |
|----------------------------------------|---------------|---------|---------------|--------------|--------------|
|                                        | EL4, LBRM     | Spleen  | Normal cells  | Jurkat       | CTCL         |
| Native $M_r$ <sup>c</sup>              | 32,000        | 32,000  | 15,000-18,000 | 15,400       | 16,000       |
| $M_r$ of protein chain <sup>c</sup>    | 22,000-23,000 | 17,000  | <sup>a</sup>  | <sup>a</sup> | <sup>a</sup> |
| Approx. ED <sub>50</sub> (pg)          | 75            | -       | 135           | 200          | -            |
| Approximate yield (ng/ml) <sup>d</sup> | 100-400       | 2       | 100-200       | 400          | -            |
| pI                                     | 3.9-5.0       | 3.9-4.9 | 6.8-8.2       | 8.2<br>(7.9) | 4.5          |

<sup>a</sup>Data compiled from the following references: mouse LBRM33: Gillis *et al.*, 1982; mouse EL4: Farrar *et al.*, 1980, 1982; and our own data; mouse spleen: Shaw *et al.*, 1978a; Watson *et al.*, 1979b; human PBL: Welte *et al.*, 1982; Gillis *et al.*, 1980b, 1982; Mier and Gallo, 1980; human tonsil lymphocytes: Robb and Smith, 1981; Jurkat cells: Robb and Smith, 1981; Robb *et al.*, 1981, 1983; CTCL: Gootenberg *et al.*, 1982.

<sup>b</sup>CTCL, cutaneous T-cell leukemia/lymphoma; ED<sub>50</sub>, amount of activity in 1 ml that produces 30% maximal response;  $M_r$ , relative molecular weight.

<sup>c</sup>Values are generally based on behavior displayed with gel chromatography, except for mouse spleen, which is based on sedimentation and Stokes radius (Shaw *et al.*, 1978a). Data refer to behavior on SDS-PAGE and reflect apparent  $M_r$  with reference to markers. The exception to this is the value for Jurkat, which is based on inferred protein sequence derived from cloned cDNA (Taniguchi *et al.*, 1983).

<sup>d</sup>Yields are estimated from the activities measured in culture supernatants on the assumption that the highest specific activity material described in the text represents essentially pure IL-2. They are not corrected for the numbers of cells, and so forth. It should be noted that typically primary leukocyte cultures (spleen, PBL) are at a higher density than are cultures of tumor cells.

Die aktive Proteinfraction hatte ein Molekulargewicht von 30000 Dalton (bei der Maus), der pI lag zwischen 3,8 und 4,8.

Drei Jahre nach Paetkau veröffentlichten Solbach et al. (1983) einen Artikel, in dem sie die bekannten Parameter von IL 2 von Mensch, Maus und Ratte zusammenfaßten:

Tab. 2 Physikochemische Eigenschaften von IL 2. (aus Solbach et al., 1983)

**Tabelle 1. Physiko-chemische Eigenschaften von Interleukin-2**

| Eigenschaften                                                                             | Interleukin-2 gewonnen aus |            |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------|------------|
|                                                                                           | Maus                       | Ratte      | Mensch     |
| Molekulargewicht                                                                          | 30000                      | 15000      | 15000      |
| Salzkonzentration für<br>Elution von DEAE-<br>Zellulose<br>(M NaCl, pH 7,6)               | 0,15                       | 0,05       | 0,05       |
| Isoelektrisches Profil                                                                    | pI 4,3;4,9                 | pI 5,4-5,5 | pI 6,0-8,2 |
| pH-Stabilität                                                                             | 2,0-9,0                    | 2,0-9,0    | 2,0-9,0    |
| Harnstoff-Stabilität<br>(4 M)                                                             | ja                         | ja         | ja         |
| Protease-Stabilität<br>(Trypsin, Chymotrypsin,<br>Subtilisin, Leucin,<br>Amino-Peptidase) | nein                       | nein       | nein       |
| DNase-, RNase-<br>Stabilität                                                              | ja                         | ja         | ja         |
| Hitzestabilität<br>(56° C, 1 h)                                                           | ja                         | ja         | ja         |

Aus dem gleichen Jahr stammt eine Veröffentlichung von Taniguchi und seinen Mitarbeitern. Ihm war es gelungen, den Immunologen aus einem Dilemma zu helfen. Bis dahin gewann man Interleukin 2 immer aus verschiedensten Zellkulturen (Milzzellen, Lymphomzellen, Zellen aus Lymphknoten etc.). Zwar war es möglich, IL 2 auch über längere Zeit und in größeren Mengen zu gewinnen, aber es mußte immer über aufwendige Methoden gereinigt und standardisiert werden. Taniguchi gelang es, das eine Gen ausfindig zu machen, das Interleukin 2 kodiert. Damit war auch die Primärstruktur von IL 2 bekannt (Abb. 2).

Von den 153 Aminosäuren (bei der Maus sind es 149 AS/Strang) scheinen die ersten 20 nur als Startsignal bei der Synthese von Bedeutung zu sein. Wenn sie abgespaltet werden, bleibt ein voll aktives IL 2-Molekül übrig. Für sein Molekulargewicht hat man 15420 Dalton errechnet. Das deckt sich mit den Ergebnissen verschiedenster Forschungsgruppen und beweist gleichzeitig, daß alle höheren Molekulargewichte, die beschrieben wurden, auf Glykosidreste zurückzuführen sind, die an das IL 2-Protein gebunden sind. Daß IL 2 Glykoproteincharakter hat, wurde bereits 1972 angenommen (Watson et al., 1982).

Außer der cDNA kann auch die mRNA in Mikroorganismen (z.B. E. coli) eingeschleust werden, so daß diese IL 2 in Reinstform produzieren (Paetkau et al., 1984).

<sup>1</sup>  
Met Tyr Arg Met Gln Leu Ser Cys Ile Ala  
ATG TAC AGC ATG CAA CTC CTC TGT TGC ATT CCA

Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu  
CTA ACT CTT GCA CTT CTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG

<sup>40</sup>  
Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr  
CAG CAT TTA CTC CTG CAT TTA CAG ATG ATT TTC AAT GCA ATT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC

<sup>60</sup>  
Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT CAG TCT CTA GAA

<sup>80</sup>  
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg  
GAA GAA CTC AAA CCT CTG CAG GAA CTG CTA AAT TTA GCT CAA ACC AAA AAC TTT CAC TTA ACA CCC AGC

<sup>100</sup>  
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu  
GAC TTA ATC ACC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA AAG GCA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA

<sup>120</sup>  
Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile  
TAT GCT GAT CAG ACA ACC ATT GTA CAA TTT CTC AAC AGA TCG ATT ACC TTT TCT CAA ACC ATC ATC

<sup>140</sup>  
Ser Thr Leu Thr  
TCA ACA CTA ACT  
Abb. 2 Basensequenz der cDNA und Primärstruktur von  
humanem IL 2 (Taniguchi et al., 1983; aus Farrar et  
al., 1984)

Neben den chemischen Charakteristika wurden und werden vor allem die biologischen Funktionen von Interleukin 2 genauestens untersucht.

IL 2 ist ein lösliches, nicht antigenspezifisches Produkt einer aktivierten T-Lymphozyten-Subpopulation. Es stammt von T-Helferzellen. Ihre Entfernung aus der Kultur hat zur Folge, daß kein IL 2 produziert wird (Farr et al., 1977; Smith et al., 1979; Larsson et al., 1980). Die Produktion von IL 2 ist von der Anwesenheit von Antigen (oder Lektin) und IL 1 abhängig. Fehlt das eine und/oder das andere, kommt es nicht zur Sekretion von IL 2 (Larsson et al., 1980; Smith et al., 1980; Wagner et al., 1980). IL 2 wirkt auf antigenstimulierte T-Zellen, gleich welcher Herkunft. Es regt sie zur Proliferation an. Die Höhe der Proliferationsrate ist nur von der verfügbaren Menge von IL 2 abhängig (Solbach et al., 1983). T-Zellen, die nicht antigenstimuliert sind, exprimieren keinen Rezeptor für IL 2 und reagieren deshalb nicht auf das Lymphokin. Die Bindung von IL 2 an den Rezeptor ist reversibel, temperaturabhängig, und sie folgt einer Sättigungskinetik (Robb et al., 1981). IL 2 wirkt zumindest teilweise speziesübergreifend. So wirkt zwar Interleukin 2 von Mensch und Ratte auf murine Zellen, umgekehrt aber IL 2 von Mäusen nicht auf humane Zellen (Gillis et al., 1978). Das liegt wahrscheinlich an der dimeren Struktur von murinem IL 2 (Caplan et al., 1981). IL 2 von Primaten wirkt bei Mensch und Maus (Rabin et al., 1981). IL 2 ist in kleinsten Mengen hoch wirksam. So konnte man eine Wirkung schon mit 4ng/ml Protein, das entspricht  $10^{-10}$ M, sicher nachweisen (Paetkau et al., 1980).

Die Aktivität von Interleukin 2 ist auch mit Hilfe von

Affenzellen (Rabin et al., 1981; Yokota et al., 1985), bei der Ratte (DiSabato, 1982) und beim Rind (Brown, 1985) nachgewiesen. Selbst die Fische haben ein ähnlich funktionierendes Lymphokin (Grondel und Harmsen, 1984).

Für alle Versuche mit Interleukin 2 war es von großem Vorteil, daß sich sowohl der qualitative als auch der quantitative Test recht einfach und in verhältnismäßig kurzer Zeit durchführen lassen.

T-Zellen, gleich welcher Herkunft (Thymus, Milz, Lymphknoten oder PBL) und gleich, ob frisch kultiviert oder aus einer Langzeitkultur, werden mit einem Antigen stimuliert und einige Tage inkubiert. Zu diesen Zellen wird das IL 2-haltige Präparat zugegeben. Den Zellen wird später 3H-Thymidin zugesetzt, und ihre Stimulation wird nach bestimmter Zeit daran gemessen, wieviel 3H-Thymidin sie eingebaut haben. Die Einbaurrate ist ein Maß für die ablaufende DNA-Synthese und somit für die Mitoserate der Zellen. Weil aber die Mitoserate der Zellen von der Menge des angebotenen IL 2 abhängt, steigt die Einbaurrate für 3H-Thymidin direkt proportional zur vorhandenen Menge von IL 2.

Auch Interleukin 2 selbst ist ohne großen Aufwand zu verarbeiten. Es ist sehr stabil und läßt sich bei -20°C über Monate aufbewahren. Im Kühlschrank bei 4°C verschwindet seine Aktivität innerhalb von fünf Wochen, es sei denn, man setzt 1% bovines Serumalbumin (BSA) zu (Schnetzler et. al., 1983). Die verschiedenen Schritte der Reinigung scheinen die Struktur des IL 2-Moleküls nicht oder so wenig zu verändern, daß kein Aktivitätsverlust zu beobachten ist. Das gleiche gilt bei verschiedenen Zusätzen zum Kulturmedium, wie z.B. 2-

Mercaptoethanol. Zwischen pH 2 und pH 10 ist IL 2 ebenfalls stabil. Allerdings geht die Aktivität von IL 2 innerhalb kürzester Zeit verloren, wenn es rein, also ohne andere Proteine in der Lösung gehalten wird. Deshalb sollte es in serum- oder albuminhaltigen Lösungen gelagert werden (Paetkau et al., 1985).

Solbach und seine Mitarbeiter haben in einem Artikel, der 1983 erschienen ist, die "biologischen Wirkungen von IL 2 in vivo und seine mögliche physiologische und therapeutische Bedeutung" beschrieben:

"Die beschriebenen in vitro Eigenschaften von IL 2 lassen diese Substanz in zweierlei Hinsicht als ein potentiell wichtiges Immunotherapeutikum in vivo erscheinen:

1. Es ist möglich geworden, mit Hilfe von IL 2 antigenspezifische zytotoxische Zellen in großen Mengen in vitro zu kultivieren und diese dann als funktionell kompetente Effektorzellen einem autologen Empfänger zu reinjizieren. Lin et al. kultivierten ZTL, die spezifisch gegen Influenza A Virus sensibilisiert waren. Die Injektion dieser Zellen in Influenza A-infizierte Mäuse reduzierte signifikant deren Mortalität (Lin und Askonas, J. Exp. Med 153, 225 (1981)). Zarling und Bach züchteten zytotoxische T-Lymphozyten, die autologe Leukämiezellen in vitro lysierten (Zarling und Bach, Nature 280, 685 (1979)). Über ähnliche T-Zellkulturen mit Spezifität für autologe Melanomzellen wird z.Z. gearbeitet.
2. Es gibt eine Reihe Hinweise dafür, daß unter bestimmten Bedingungen die direkte in vivo Applikation von IL 2-haltigem Material einen immunstimulierenden Effekt hat:

- a) eine in normalen Mäusen ablaufende zytotoxische Im-

munreaktion konnte durch Verabreichung von IL 2 in ihrem Ausmaß gesteigert werden (Wagner et al., Immunobiology, 139 (1982)).

b) Injektion von IL 2 in Mäuse mit einem funktionellen T-Zell-Defekt führte zur Wiederherstellung ihrer Fähigkeit, zytotoxische T-Zellen gegen Alloantigene zu generieren (Wagner et al., Nature 284, 278 (1980)), sowie die zum Aufbau einer B-Zell-Antwort benötigten T-Helferzellen gegen Schafserythrozyten reifen zu lassen (Stötter et al., Eur. J. Immunol. 10, 719 (1980)).

Erste Versuche, bei denen Melanompatienten IL 2-haltiges Material systemisch injiziert wurde, zeigten eine gesteigerte Zytotoxizität der Patientenlymphozyten gegen die Tumorzellen in vitro.

Neben der prospektiven Möglichkeit, durch IL 2-Gabe in vivo das Immunsystem stimulieren zu können, scheint auch das Gegenteil von potentielllem Interesse, insofern, als vorstellbar ist, daß eine Reduktion von verfügbarem IL 2 einen "hyporeaktiven" Immunität hervorzurufen vermag:

a) Seit einiger Zeit wird als Immunsuppressivum Cyclosporin A in der klinischen Organtransplantation eingesetzt (Klaus, Immunology Today 2, 83 (1981)). Diese Substanz hat gegenüber konventionellen Immunsuppressiva eine geringe Myelotoxizität und hemmt in therapeutisch erreichbaren Dosen konzentrationsabhängig die Freisetzung von Interleukin 2 durch humane oder murine T-Helferzellen in vitro (Bunjes et al., Eur. J. Immunol. 11, 657 (1980)). Darüber hinaus blockiert Cyclosporin A die T-Zell-abhängige Freisetzung von Interleukin 1 aus Makrophagen (Bunjes, 1981). Der immunsuppressive Effekt ließe sich somit über einen Ausfall der Interleukin 2-Produktion erklären.

b) Glukokortikoide sind seit langem als Immunsuppressiva bekannt. Auch hier scheint die immunsuppressive Wirkung u.a. auf ihrer Fähigkeit zu beruhen, die IL 1-Produktion und als Folge davon die IL 2-Produktion in vitro zu hemmen (Smith, 1980).

Möglicherweise spielt IL 2 auch eine Rolle für das Wachstumsverhalten maligner T-Zellen: T-Zell-Linien, die von Patienten mit malignen kutanen T-Zell-Lymphomen etabliert wurden (Gootenberg et al., J. Exp. Med. 154, 1403 (1981); Poiesz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6815 (1980)), produzieren zwar IL 2 in vitro, benötigen ihr eigenes Produkt jedoch zum (leukämischen) Wachstum. Sollte sich diese leukämogenetische Potenz im Sinne der 'Autostimulation' (Sporn und Todarno, N. Engl. J. Med. 303, 878 (1980)) als generelles Phänomen darstellen, könnte eine Verminderung an zur Verfügung stehendem IL 2 mittels Cyclosporin A, Glukokortikoiden oder eines Interleukin 2-Antikörpers ein rationales chemotherapeutisches Prinzip darstellen." (Aus Solbach et al., 1983).

Mertelsmann (1986) erforschte die mögliche Antitumorwirkung von Interleukin 2 sowohl in vitro als auch in vivo. Er fand heraus, daß IL 2 allein oder in Kombination mit anderen Therapeutika eine meßbare Besserung von Tumorerkrankungen bewirken kann.

### 1.1.2 Interleukin 2 beim Haushuhn

Hühner - eigentlich ganz allgemein die Vögel - sind für Immunologen besonders interessant. Zwar weist ihr Immunsystem einige deutliche Unterschiede zu dem der Säuger

auf, anatomische und auch funktionelle, aber trotzdem sind viele Funktionen ähnlich oder sogar gleich denen der Säuger, so daß Forschungsergebnisse zum großen Teil Rückschlüsse zulassen, die auch für Humanimmunologen von Interesse sind.

Von den anatomischen Unterschieden fallen drei besonders auf: 1) Das Fehlen echter Lymphknoten. Die Vögel haben zwar Lymphknotenäquivalente z.B. entlang der Gefäße der Extremitäten, aber es fehlen ihnen die Lymphknoten an allen inneren Organen. Andererseits existieren aber die Zäkaltonsillen. 2) Der Thymus ist beim Vogel, anders als beim Säuger, in mehrere Läppchen (Lobi) unterteilt. 3) Die Bursa Fabricii. Dieses Lymphorgan, das erstmals 1621 von Fabricius beschrieben wurde, gibt es beim Säuger nicht.

Von dem Vorhandensein zweier unterschiedlicher Organe zur Ausreifung der Lymphozyten leitet sich auch ihre Unterteilung in B- und T-Zellen ab, die gleichzeitig für die unterschiedliche Funktion dieser Zellen steht (s.o.), und die für Vögel und Säuger gleichermaßen gilt. Sowohl der Thymus als auch die Bursa Fabricii entwickeln sich beim Hühnerembryo verhältnismäßig früh. So ist die Thymusanlage ab dem zweiten, die Bursaanlage ab dem vierten Bebrütungstag nachweisbar. Aber während beim Thymus die volle Ausbildung in Rinde (Cortex) und Mark (Medulla) bis zum Schlupf abgeschlossen ist, braucht sie bei der Bursa noch einige Zeit nach dem Schlupf.

Beide, Bursa und Thymus, werden noch in der ersten Hälfte der Bebrütungszeit mit Stammzellen besiedelt. Die Stammzellen sind hämatogenen Ursprungs und zunächst noch so undifferenziert, daß sie sowohl zur B- als auch zur T-Zelle werden können (Eskola und Toivanen, 1976). In

den lymphatischen Organen reifen die Stammzellen zu Lymphozyten aus. Nach unterschiedlich langer Zeit verlassen die reifen Lymphozyten dann Bursa und Thymus.

Unterschiede im Immunsystem von Säuger und Vogel findet man auch bei den Immunglobulinen. Trotzdem sind die Ähnlichkeiten so groß, daß die Immunglobulinklassen auch beim Huhn mit IgG, IgM und IgA bezeichnet werden.

Prinzipiell ist die Funktionsweise des Immunsystems von Säuger und Vogel sehr ähnlich. So reagieren die Lymphozyten und die Makrophagen vom Huhn (wie die der Maus) in vitro gegen Schafserythrozyten (Evans und Invanyi, 1974). Es gibt wie beim Säuger NK-Zellen (Fleischer, 1980), zellvermittelte Zytotoxizität (Kirchner und Blaese, 1973), aber auch Lymphokine wie Interleukin 1 (Hayari et al., 1982) und Interleukin 2 (Schauenstein et al., 1982; Schnetzler et al., 1983).

Interleukin 2 vom Haushuhn unterscheidet sich biologisch und chemisch kaum von dem der Säuger. Es ist ein Protein oder Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 13000 Dalton (Schnetzler et al., 1983; Vainio et al., 1986). Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,9. Die Überprüfung der Bedingungen zur Lagerung zeigten, daß es ebenso stabil ist wie IL 2 vom Säuger, bei -20°C über Monate haltbar bleibt und hochgereinigt zumindest im Kühlschrank (4°C) nur nach Zugabe von 1% BSA länger als fünf Wochen stabil ist (Schnetzler et al., 1983). CsA, das in der Krebstherapie eingesetzt wird und immunsuppressiv wirkt (s.o.) hat in vitro keinen dauerhaft hemmenden Einfluß auf die IL 2-abhängige Proliferation von T-Lymphozyten (Schnetzler et al., 1983).

Versuche zur Kinetik von aviärem IL 2 zeigten, daß die höchsten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbauraten mit Zellen zu erreichen waren, die mit Kulturüberständen von 24-stündigen T-Zellkulturen inkubiert wurden (Schnetzler et al., 1983). Die T-Zellkulturen werden beim Vogel - wie auch beim Säuger - mit Con A stimuliert. Con A wirkt auch beim Vogel T-Zell-spezifisch (Toivanen und Toivanen, 1973). Ob IL 2 der einzelnen Vogelarten auf T-Zellen der anderen Arten wirkt, wie das bei Mensch, Ratte und Maus der Fall ist, ist noch nicht erforscht. Murines IL 2 hat keinen Einfluß auf die Proliferation von aviären T-Lymphozyten, und auch umgekehrt IL 2 vom Huhn keine Wirkung auf Zellen von der Maus (Schauenstein et al., 1982). Im Prinzip laufen aber die Regelvorgänge, die zur Synthese von Interleukin 2 führen, bei Vogel und Säuger in gleicher Weise ab. Und auch die Wirkungsweise von IL 2 auf die Zellen ist gleich.

## 1.2 Die UM-B19-Linie

Bei Reihenuntersuchungen der Immunglobuline von Hühnern beobachteten Brüggemann und seine Mitarbeiter bei einem der Tiere eine Immundefizienz (Brüggemann et al., 1967). Es handelte sich um einen Hahn der Heisdorf-Nelson-Lohmann Linie. Er wurde daraufhin mit mehreren normalen Leghorn-Hennen gepaart. Nur fünf der Nachkommen zeigten ebenfalls die beobachtete Dysgammaglobulinämie, und vier von ihnen hatten sie nur bis zum Erwachsenenalter. Alle stammten von der gleichen Henne ab.

In der Folge wurde versucht, eine Zuchtlinie aufzubauen. Man hatte allerdings mit erheblichen Schwierigkeiten zu

kämpfen. So war zeitweise die Zahl der Nachkommen so gering, daß außer den im Rahmen der Inzucht sinnvollen Bruder-Schwester-Paarungen alle verfügbaren Tiere ohne Rücksicht auf den Grad der Verwandtschaft gekreuzt wurden. Noch erschwert wurde die Zucht durch die Tatsache, daß ein Teil der Hähne paarungsunfähig oder sogar infertil ist. Trotzdem konnte nachgewiesen werden, daß die Dysgammaglobulinämie erblich ist, und daß die Zahl der Merkmalsträger von Generation zu Generation zunimmt (Lösch, 1972).

Bis 1977 war es gelungen, eine Inzuchtlinie herauszuzüchten, die in ihrem Haupthistokompatibilitätsloкус B19 homozygot ist (Fiedler et al., 1980). Der Erbgang der Dysgammaglobulinämie ist nicht an die Blutgruppe gebunden; die Linie wurde durch die selektive Vermehrung der B19-Nachkommen aus der ursprünglich heterogenen Population gewonnen.

Im Lauf der Jahre wurden die verschiedensten Parameter, die im Zusammenhang mit den Immunreaktionen von Interesse sind, an Tieren der UM-B19-Linie erforscht.

Besonderes Augenmerk wurde natürlich auf die Verteilung der Immunglobuline im Serum gelegt. Verlaufskontrollen zeigen, daß die Tiere bereits beim Schlupf erhöhte IgA- und IgM-Serumtiter haben. In der dritten bis sechsten Lebenswoche kommt es zu einem vorübergehenden Peak von IgG. Bei einigen Tieren normalisiert sich der IgG-Titer bis zum Eintritt der Geschlechtsreife weitgehend (transitorische Form). Aber auch bei diesen Tieren bleiben IgM und IgA im Serum weiterhin erhöht (Lösch et al., 1981).

Die Immunisierung mit den verschiedensten Antigenen

führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Häufig zeigten die dysgammaglobulinämischen Tiere keine oder nur sehr geringe Antikörperbildung. Oder sie reagierten z.B. auf die Immunisierung mit HSA mit einer ausschließlichen und deutlich erhöhten IgM-Synthese (Lösch et al., 1972). Normalerweise induziert HSA die Bildung von IgG-Antikörpern. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Immunisierung der Tiere mit *Brucella abortus*. Hier wurden aber außer der gesteigerten IgM-Synthese auch noch erhöhte IgA-Titer gefunden (Lösch et al., 1982). Andererseits konnte mit LPS sogar bei den dysgammaglobulinämischen Tieren eine vorübergehende Bildung von IgG-Antikörpern induziert werden. Und auch die Gabe von Levamisol hatte einen ähnlichen Effekt (Kühlmann-Rabens et al., 1986).

Die Ursache der verschobenen Immunglobulintiter im Serum der dysgammaglobulinämischen UM-B19-Tiere ist ein hochgradiger Defekt in der Synthese von IgG (Herlyn et al., 1977). Auch fehlen cytoplasmatisch IgG-positive Zellen in den lymphatischen Organen. Die Verteilung der IgM- und IgA-positiven Zellen erschien dagegen normal (Lösch und Hoffman-Fezer, 1973).

Die T-zellvermittelten Immunreaktionen wie z.B. die Transplantatabstoßung oder die Allergie von verzögerten Typ scheinen auch bei den dysgammaglobulinämischen Tieren normgerecht abzulaufen (Lösch, 1972).

Die Übertragung von T- und B-Lymphozyten normogammaglobulinämischer Tiere der UM-B19-Linie zeigte nur eine vorübergehende Wirkung auf die IgG-Synthese der dysgammaglobulinämischen Tiere. Eine dauerhafte Rekonstitution der IgG-Synthese war nicht möglich (Princz, 1985).

Außer IgG im Serum fehlen den dysgammaglobulinämischen Hühnern auch nach Mehrfachimmunisierung Antikörper der

IgG-Klasse. Grundsätzlich ist aber die Fähigkeit zur Bildung von IgG vorhanden, wie z.B. die Versuche von Kühlmann-Rabens et al. (1986) beweisen. Also wurde als Grund für den selektiven IgG-Mangel eine Verzögerung der B-Zellreifung angenommen. Der Grund dafür könnte ein gestörtes Microenvironment in der Bursa Fabricii sein. Die Verzögerung der B-Zellreifung führt ihrerseits zur überschießenden Produktion von IgM, weil ein hemmender Rückkopplungseffekt von IgG auf IgM fehlt. Als Ursache der Dysgammaglobulinämie wird aber auch eine Störung im IgG-spezifischen T-Helfer - T-Suppressorverhältnis, ein defekter T-Helferfaktor oder ein B-Zell-Rezeptordefekt diskutiert (Tiemeyer, 1986).

Die Tiere der UM-B19-Linie zeigen zum Teil eine Dysgammaglobulinämie, die sich u.a. durch das Fehlen oder einen deutlichen Mangel von IgG äußert. Die Ursache ist ein Synthesedefekt für IgG (Herlyn et al., 1977). Weil die Tiere zumindest vorübergehend oder nach bestimmten Behandlungsmethoden IgG bilden können, muß man davon ausgehen, daß der Fehler nicht in einer grundsätzlichen Unfähigkeit der B-Zellen zur IgG-Synthese zu suchen ist.

Als Ursache der Dysgammaglobulinämie kommen Abweichungen bei den B-Zellen aber auch auf der Seite der T-Zellen in Betracht (Lösch et al., 1981; Lösch et al., 1982). Als mögliche Störungen auf der Seite der T-Zellen wird das Fehlen isotypspezifischer Helferzellen, ein defekter T-Helferfaktor, erhöhte T-Suppressoraktivität und ein gestörtes Verhältnis zwischen T-Helfer- und T-Suppressorzellen diskutiert.

In einer umfangreichen Untersuchung fand Tiemeyer (1986) u.a. eine verminderte Proliferationsrate der T-Zellen von dysgammaglobulinämischen Tieren, die mit Con A stimuliert worden waren. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß auch eine Störung im T-Zellsystem vorliegen muß. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Zellen der dysgammaglobulinämischen Tiere keine supprimierenden Faktoren abgeben. Deshalb diskutierte Tiemeyer, daß die niedrigere Proliferationsrate die Folge einer verminderten Bindungsfähigkeit für Concanavalin A oder aber Ausdruck einer verminderten Fähigkeit zur Synthese von Interleukin 2 sei.

In der Literatur sind von verschiedenen Autoren Assays zur quantitativen Analyse von Interleukin 2 beschrieben worden (Schauenstein et al., 1982; Pink und Vainio, 1983; Schnetzler et al., 1983). Der IL 2-Test sollte in der Abteilung von Prof. Dr. Lösch etabliert werden. Mit diesem Test sollte dann geprüft werden, ob Unterschiede in der Produktion von Interleukin 2 zwischen den Tieren der UM-B19-Linie und Kontrolltieren zu finden sind. Vor allem interessant schien, ob die Produktion von IL 2 bei den dysgammaglobulinämischen Tieren der UM-B19-Linie eingeschränkt ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiermaterial

##### 3.1.1 UM-B19-Hühner

Als Grundlage für die Herstellung der Kulturüberstände diente Vollblut bzw. die Lymphozyten von Tieren der UM-B19-Linie. Die Tiere - sowohl Hähne als auch Hennen - waren mehr als drei Monate alt.

Weil nicht ausgeschlossen werden kann, daß dysgammaglobulinämische Tiere normale Serumtiter von IgG erreichen (transitorische Form der Dysgammaglobulinämie), wurden die Tiere immer wieder auf ihren derzeitigen Status hin ausgetestet. Bei Versuchsbeginn lag der letzte Test nie länger als zwei Wochen zurück.

##### 3.1.2 Kontrolltiere

Als Kontrolltiere dienten weiße Leghornhennen und -hähne. Sie waren teils zugekauft, zum Teil im Institut geschlüpft und aufgezogen. Auch diese Tiere waren bei Versuchsbeginn mindestens drei Monate alt. Lymphozyten der Kontrolltiere dienten als Testzellen, es wurden aber auch von ihnen Con A-Überstände gewonnen.

Die Tiere beider Gruppen wurden teils einzeln, teils in kleinen Gruppen auf Gitterrosten gehalten und mit handelsüblichem pelletierten Futter und Wasser ad libitum ernährt.

### **3.2 Lymphozytengewinnung**

#### **3.2.1 Blutentnahme**

Nach Desinfektion der Haut mit Alkohol wurde den Tieren etwa 5ml Blut aus der Vena jugularis entnommen. Dazu wurde eine 10ml-Einmalspritze verwendet, in der ca. 0,05ml Liquemin (verdünnt 1:20, Merck, Darmstadt) aufgezogen war.

#### **3.2.2 Trennung der Lymphozyten**

Das Vollblut wurde mit RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, UK) 1:2 verdünnt und anschließend vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen über 10ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geschichtet. Dann wurde bei 18°C und 1200U/min 40 Minuten zentrifugiert (IEC PR-J Centrifuge, Damon IEC Division). Die Lymphozytenschicht, die zwischen Ficoll-Paque und der RPMI-Plasma-Schicht liegt, wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgehoben, in RPMI 1640 resuspendiert und erneut zentrifugiert (1000U/min, 10min). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.

#### **3.2.3 Zellzählung**

100µl Zellsuspension wurden mit 100µl Trypanblau (Seromed, Biochrom, Berlin) sorgfältig vermischt (lebend-tot-Färbung) und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, UK), dem 1% L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) und 10% fetales Kälberserum (FCS) (Flow Laboratories, Irvine, UK) zugesetzt waren. Das Kälberserum wurde bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert. Außerdem wurde dem Medium noch 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) in einer Endkonzentration von  $5 \times 10^{-4}$  mol zugesetzt.

#### 3.3.2 Kultivierung der Zellen

Die getrennten und gewaschenen Lymphozyten (s.3.2.2) wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Fraktionen von 10ml in 50ml-Plastifläschchen (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) einpipettiert. Inkubiert wurden die Zellkulturen bei 39°C, in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Heraeus-Brutschrank).

#### 3.4 Mitogene Stimulation der Zellen

In die vorbereitete Zellsuspension (s. 3.2 und 3.3) wurden 15µg/ml Concanavalin A (Con A) (Pharmacia, Uppsala, Schweden) einpipettiert.

Zur Kontrolle der mitogenen Stimulation wurde auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Dellen (Nuncclon, Roskilde,

Dänemark) folgender Ansatz gemacht: Sechs Dellen wurden mit je 100µl der Zellsuspension beschickt. Je drei Dellen wurden mit 100µl Kulturmedium, die anderen drei Dellen mit 15µg/ml Con A (ebenfalls 100µl Lösung) versetzt. Diesem Ansatz wurde nach 72 Stunden Inkubationszeit  $^3\text{H}$ -Thymidin zugesetzt. Nach weiteren sechs Stunden Inkubation wurde der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau gemessen und dann ausgewertet (s. 3.5.2ff).

#### 3.4.1 Überstand Concanavalin A-stimulierter Lymphozyten (Con A-Überstand)

Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellsuspension (s. 3.2, 3.3 und 3.4) aus den Zellkulturfläschchen in Zentrifugengläser umgefüllt und bei 1000U/min zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Kulturüberstand vorsichtig in sterile Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) pipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert. Vor dem Test wurde dem Con A-Überstand 0,1 M  $\alpha$ -MM zugefügt.

#### 3.4.2 Testzellen für den IL 2-Test

Für die Gewinnung der Testzellen wurden die Con A-stimulierten Lymphozyten (s. 3.2, 3.3 und 3.4) 72 Stunden inkubiert. Dann wurden sie in Zentrifugengläschen umgefüllt und abzentrifugiert (1000U/min, 10min). Anschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium, dem 0,1 M Alpha-Methyl-Mannosid ( $\alpha$ -MM, Sigma, St. Louis, MO) zugefügt war, gewaschen, dann gezählt und in dem  $\alpha$ -Methyl-

Mannosid-haltigem Medium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen.

### 3.4.3 Kontrollüberstände

Zur Herstellung von Kontrollüberständen wurden vorbereitete Lymphozyten (s. 3.3) in Kulturfläschchen gefüllt und ohne Con A 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und die Kontrollüberstände eingefroren. Auch zu den Kontrollüberständen wurde vor dem Test 0,1 M  $\alpha$ -MM zugegeben.

## 3.5 Bestimmung der Interleukin 2-Aktivität

### 3.5.1 Ansatz der Mikrotiterplatte

Die Suspension der Testzellen (s. 3.4.2) wurde in Fraktionen von je 100  $\mu$ l auf eine Mikrotiterplatte (Nuncclon, Dänemark) pipettiert. Die Con A-Überstände (s. 3.4.1) wurden 1:5 mit  $\alpha$ -MM gemischt (Endkonzentration 0.1 M  $\alpha$ -MM). Dann wurden jeweils drei Dellen mit Testzellen mit 100  $\mu$ l eines Überstands versetzt. Zur Ermittlung des Leerwertes wurden drei Dellen mit Testzellen mit Kontrollüberstand (s. 3.4.3), dem ebenfalls  $\alpha$ -MM zugefügt war, angesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde 18 Stunden inkubiert (39°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **3.5.2      $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau**

Zur Bestimmung der Zellteilungsrate wurde der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die Zellen gemessen. In jede Delle der Mikrotiterplatte wurden 10  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin (100  $\mu\text{Ci/ml}$ , Amersham Buchler, Braunschweig) einpipettiert und die Platte anschließend weitere sechs Stunden inkubiert.

### **3.5.3      Ernte der Zellen**

Die Ernte der Zellen aus der Mikrotiterplatte erfolgte mit einem Titertek-Cell-Harvester (Flow Laboratories, Meckenheim). Als Filter dienten Glasfiberfilter (Flow Laboratories, Meckenheim). Die getrockneten Filterplättchen wurden in Zählfläschchen aus Kunststoff (Zinsser, Frankfurt/Main) gegeben, und die Fläschchen mit 10 ml Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt/Main) aufgefüllt.

### **3.5.4      Ermittlung des radioaktiven Einbaus**

Die Zählfläschchen wurden im Szintillationszähler (Pakard, Frankfurt/Main) vorgekühlt und anschließend je zehn Minuten ausgezählt. Nach dieser Zählzeit wird der Mittelwert für eine Minute Zähldauer berechnet.

## **3.6          Absorptionsversuch**

Große Mengen wie üblich aufbereiteter Blutlymphozyten (PBL) (s. 3.4.2) wurden in Kulturflaschen angesetzt. Ein

Teil dieser Zellen blieb ohne Con A-Zusatz, der andere Teil wurde mit der üblichen Menge Con A stimuliert. Am Tag 3 wurden alle Zellen abzentrifugiert, wie üblich mit Vollmedium und  $\alpha$ -MM gewaschen und anschließend die Zellsedimente beider Ansätze mit Con A-Supernatant gemischt (Verhältnis 1:10). Bei 4°C wurde der Ansatz eine halbe Stunde inkubiert und dabei mehrere Male geschüttelt. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand auf die vorbereiteten Testzellen aufgebracht. Nach 18-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin versetzt, noch einmal 6 Stunden inkubiert und dann geerntet (Ansatz modifiziert nach Vainio et al., 1986).

### 3.7 Auswertung der Ergebnisse

Aus den drei Werten für jeden Überstand wurde der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert der Zellen, die mit Kontrollüberstand versehen waren, diente als Leerwert. Alle anderen Werte eines Versuchsansatzes wurden auf diesen Wert bezogen:

$$\text{Stimulationsindex (Si)} = \frac{\text{x (cpm Proben mit Con A-Sup.)}}{\text{x (cpm Proben mit Kontrollsup.)}}$$

In gleicher Weise wurde auch der Stimulationsindex für Con A-stimulierte PBL berechnet, wobei der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in PBL, die ohne Con A inkubiert worden waren, als Leerwert diente.

Aus den Mittelwerten der Stimulationsindices jedes Überstands einer Tiergruppe wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung ( $s$ ) berechnet. Die Prüfung auf Unterschiedlichkeit zweier Meßreihen wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

#### 4.1           Etablierung des Interleukin 2-Tests

Bevor der IL 2-Test etabliert wurde, waren eine Reihe von Vorversuchen notwendig, die in der vorliegenden Dissertation nicht mit Daten dokumentiert werden. So wurde z.B. FCS und Hühnerserum als Mediumzusatz bei der Stimulation der Lymphozyten mit Con A verglichen und dabei keine deutlichen Unterschiede festgestellt. Der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau Con A-stimulierter PBL wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen. Con A-stimulierte Lymphozyten wurden nach drei bis sieben Tagen Inkubation im IL 2-Test eingesetzt. Verschiedene Konzentrationen der Lymphozyten sowohl bei der Stimulation mit Con A als auch im IL 2-Test wurden verglichen. Die Bedingungen, die für die Produktion der IL 2-haltigen Con A-Überstände und für den Test optimal erschienen, sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

#### 4.2           Stimulation von PBL mit Con A

Die Stimulationsindices wurden berechnet für männliche und weibliche Tiere der dysgammaglobulinämischen Gruppe, der normogammaglobulinämischen Gruppe und der Kontrollgruppe (Tab. 3). Bei den ersten sechs Versuchen, bei denen noch nach der zur Stimulation besten Con A-Konzentration gesucht wurde, wurde das jeweils bessere Ergebnis (10 $\mu\text{g}$  oder 20 $\mu\text{g}$  Con A/ml) in die Rechnung einbezogen.

Tab. 3 Mittelwerte und Standardabweichungen der Stimulationsindices der PBL von Kontroll-, normo- und dysgammaglobulinämischen Tieren nach Inkubation mit Con A

| Tier  |      | $\bar{x}$ (Si) | s    | n <sup>a)</sup> |
|-------|------|----------------|------|-----------------|
| normo | wbl. | 11,975         | 18,2 | 8               |
| normo | mnf. | 2,796          | 1,8  | 5               |
| dys   | wbl. | 10,95          | 12,3 | 7               |
| dys   | mnf. | 10,33          | 7,8  | 7               |
| Kontr | wbl. | 13,465         | 16,3 | 17              |
| Kontr | mnf. | 8,05           | 4,7  | 6               |
| normo | alle | 8,4            | 14,7 | 13              |
| dys   | alle | 10,64          | 10,0 | 14              |
| Kontr | alle | 12,1           | 14,3 | 23              |

a) Anzahl der getesteten Tiere

PBL von Tieren der UM-B19-Linie weisen nach Stimulation mit Con A nicht ganz so hohe Stimulationsindices wie PBL von Kontrolltieren auf. Innerhalb der UM-B19-Gruppe liegt der Index der dysgammaglobulinämischen Tiere etwas höher als der der normogammaglobulinämischen Tiere (Tab. 3). Die Indices der normogammaglobulinämischen und der Kontrolltiere liegen etwa auf einer Gaußschen Verteilung. Die dysgammaglobulinämischen Tiere sind eher "low" oder "high responder" mit weniger mittleren Werten. Allerdings wurden nicht genügend Tiere ausgetestet, um diesen Zusammenhang statistisch beweisen zu können.

Auffallend ist auch, daß bei den normogammaglobulinämischen und den Kontrolltieren die weiblichen Tiere im Mittelwert einen wesentlich höheren Stimulationsindex zeigten als die männlichen. Allerdings streuen ihre Werte auch viel breiter als die der Hähne.



### 4.3 Wirkung der Con A-Überstände

Von allen drei Tiergruppen - der normo-, der dysgamma-globulinämischen und der Kontrollgruppe - wurden Überstände von Con A-aktivierten PBL gewonnen.

Es wurden folgende Con A-Überstände im Test eingesetzt:

Tab. 5 Überblick über die getesteten Überstände

| Überstand |         |      |      |
|-----------|---------|------|------|
| Nr.       | Tier    |      | Sia) |
| 9/2       | B15     | mnf. | 7,4  |
| 10/1      | Kontr.  | wbl. | 4,9  |
| 10/3      | Kontr.  | wbl. | 47,4 |
| 13/2      | Kontr.  | wbl. | 16,0 |
| 15/1      | Normo   | wbl. | 56,4 |
| 15/2      | Dys     | wbl. | 35,8 |
| 15/3      | Normo   | wbl. | 6,1  |
| 15/4      | Normo   | wbl. | 5,6  |
| 15/5      | Dys     | wbl. | 1,6  |
| 16/2      | Dys     | wbl. | 21,3 |
| 20/1      | Dys     | wbl. | 6,6  |
| 20/2      | Normo   | wbl. | 1,6  |
| 23/1      | Dys     | wbl. | 4,7  |
| 23/2      | Normo   | wbl. | 5,5  |
| 31/1      | Kontr.  | wbl. | 1,0  |
| a-gam     | a-gamma | wbl. | 16,3 |
| C40       | Kontr.  | mnf. | 13,9 |
| C52       | Kontr.  | wbl. | 12,7 |

a) Stimulationsindex Con A-aktivierter PBL, von denen der Überstand gewonnen wurde.

Alle Con A-Überstände zeigten im Verlauf der Versuchsreihe unterschiedliche Stimulationsergebnisse. Allerdings gilt bis auf wenige Ausnahmen die Aussage, daß einige Überstände in allen Versuchen bessere proliferative

Wirkung hatten. So induzierte z.B. der Con A-Überstand C52 fast immer eine hohe Einbaurrate von  $^3\text{H}$ -Thymidin in den Testzellen.

Es folgt eine tabellarische Übersicht der Stimulationsindices der Testzellen nach Inkubation mit den verschiedenen IL 2-haltigen Überständen.

Tab. 6 Übersicht der Ergebnisse aus den einzelnen IL 2-Assays

| Überstand | Experiment Nr.  |      |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----------------|------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nr.       | 1               | 2    | 3                 | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  |
| 9/2       | / <sup>a)</sup> | /    | 1,4 <sup>b)</sup> | 2,5 | /   | 2,4 | 1,8 | /   | /   | /   | /   |
| 10/1      | /               | /    | 1,1               | 0,8 | 3,4 | 0,9 | 1,8 | 2,6 | /   | /   | /   |
| 10/3      | /               | /    | 1,8               | 1,6 | /   | 1,0 | 1,6 | /   | 1,1 | 0,7 | 1,4 |
| 15/1      | 1,7             | 4,7  | /                 | /   | /   | 1,0 | 1,8 | /   | 4,0 | 0,7 | 1,8 |
| 15/2      | 2,0             | 3,2  | /                 | /   | /   | 1,0 | 1,2 | /   | /   | /   | /   |
| 15/3      | 0,8             | 2,9  | /                 | /   | /   | 0,8 | 1,5 | /   | /   | /   | /   |
| 15/4      | 0,9             | 3,4  | /                 | /   | /   | 2,7 | /   | /   | /   | /   | /   |
| 15/5      | 0,7             | 2,0  | /                 | /   | /   | 1,2 | /   | /   | /   | /   | /   |
| 16/2      | /               | /    | /                 | /   | /   | /   | /   | /   | 2,6 | 0,7 | 2,3 |
| 20/1      | 3,6             | 6,2  | 1,8               | 2,4 | 0,9 | 1,8 | 2,3 | 3,5 | /   | /   | /   |
| 20/2      | 1,1             | 4,0  | 1,3               | 1,3 | 1,8 | 1,2 | 4,4 | 2,6 | /   | /   | /   |
| 23/1      | /               | /    | /                 | /   | /   | /   | 0,7 | 2,6 | 1,4 | 0,7 | 2,3 |
| 23/2      | /               | /    | /                 | /   | /   | /   | 1,1 | 2,5 | 1,6 | 0,9 | 3,0 |
| 31/1      | /               | /    | /                 | /   | /   | /   | /   | 1,5 | /   | /   | /   |
| C40       | 2,7             | 14,0 | /                 | /   | /   | /   | 4,0 | /   | /   | /   | /   |
| C52       | /               | /    | /                 | /   | /   | 4,6 | /   | /   | /   | /   | /   |

<sup>a)</sup> nicht getestet

<sup>b)</sup> Stimulationsindex der Testzellen nach Inkubation mit dem IL 2-haltigen Con A-Überstand

| Oberstand |     | Experiment Nr. |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----------|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Nr.       | 12  | 13             | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  |  |
| 9/2       | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 10/3      | 0,9 | 3,0            | 0,7 | 2,7 | 0,5 | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 13/2      | 1,3 | 5,4            | 2,8 | 8,1 | 1,9 | 1,5 | 1,9 | 2,4 | 4,3 | 1,5 | /   |  |
| 15/1      | /   | 5,0            | 1,7 | 7,5 | 1,5 | 0,3 | 1,0 | 1,1 | 3,5 | 1,1 | 1,0 |  |
| 15/2      | /   | 2,5            | 2,0 | 5,0 | 1,6 | 1,9 | 1,3 | 1,5 | 4,7 | 0,8 | 0,9 |  |
| 15/3      | /   | 5,4            | 1,4 | 4,6 | 1,0 | 1,6 | 0,6 | 0,9 | 1,3 | 0,8 | /   |  |
| 15/4      | /   | 4,5            | 1,7 | 3,8 | 1,1 | 1,3 | 1,0 | 0,9 | /   | /   | /   |  |
| 15/5      | /   | /              | /   | /   | /   | 1,0 | 0,9 | 0,5 | 1,8 | 0,7 | 0,4 |  |
| 16/2      | 1,1 | 2,3            | 1,0 | 3,8 | 1,8 | /   | /   | /   | /   | /   | 0,5 |  |
| 23/1      | 1,9 | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 23/2      | 2,6 | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 31/1      | /   | /              | /   | /   | /   | 3,4 | 1,6 | 1,5 | 3,1 | 0,7 | 0,7 |  |
| a-gam     | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | 2,1 | 0,8 | /   |  |
| C40       | /   | /              | /   | /   | /   | /   | 1,3 | 2,3 | /   | /   | 0,4 |  |
| C52       | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | 0,7 |  |

| Oberstand |     | Experiment Nr. |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----------|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Nr.       | 23  | 24             | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30  | 31  | 32  |  |
| 9/2       | /   | /              | 1,1 | 1,1 | 3,8 | 2,0 | 1,3 | 2,3 | 2,2 | 3,0 |  |
| 10/3      | /   | /              | 0,7 | 1,3 | 2,6 | 1,1 | 2,8 | 2,9 | 1,8 | 3,1 |  |
| 13/2      | /   | /              | /   | /   | 2,8 | 2,0 | 5,4 | 2,3 | 2,2 | 2,2 |  |
| 15/1      | 1,9 | 2,5            | 0,8 | 0,9 | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 15/2      | 2,2 | /              | 0,6 | 0,5 | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 15/3      | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 15/4      | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 15/5      | /   | 1,2            | 0,8 | 0,8 | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 16/2      | 1,4 | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 23/1      | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 23/2      | /   | /              | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| 31/1      | /   | /              | 1,8 | 0,6 | /   | /   | /   | /   | 1,1 | 2,2 |  |
| a-gam     | /   | /              | 2,3 | 1,3 | 0,9 | 1,4 | 2,1 | 1,8 | 1,2 | 1,2 |  |
| C40       | 1,6 | 1,4            | 3,7 | 0,8 | /   | /   | /   | /   | /   | /   |  |
| C52       | 1,0 | 2,2            | 3,4 | 1,3 | 4,5 | 1,4 | 7,8 | 2,4 | 1,0 | 1,5 |  |

Tab. 7 Mittelwerte der Stimulationsindices, Standardabweichungen und Anzahl der Tests für die einzelnen Con A-Überstände

| Überstand |        |           |     |    |
|-----------|--------|-----------|-----|----|
| Nr.       | Tier   | $\bar{x}$ | s   | n  |
| 9/2       | B15    | 2,1       | 0,8 | 12 |
| 10/1      | Kontr. | 1,8       | 1,0 | 6  |
| 10/3      | Kontr. | 1,7       | 0,9 | 20 |
| 13/2      | Kontr. | 2,9       | 1,9 | 19 |
| 15/1      | Normo  | 2,7       | 1,8 | 18 |
| 15/2      | Dys    | 1,9       | 1,3 | 17 |
| 15/3      | Normo  | 1,8       | 1,5 | 13 |
| 15/4      | Normo  | 2,1       | 1,4 | 10 |
| 15/5      | Dys    | 1,0       | 0,5 | 12 |
| 16/2      | Dys    | 1,8       | 1,0 | 10 |
| 20/1      | Dys    | 2,8       | 1,6 | 8  |
| 20/2      | Normo  | 2,2       | 1,4 | 8  |
| 23/1      | Dys    | 1,6       | 0,8 | 6  |
| 23/2      | Normo  | 2,0       | 0,8 | 6  |
| 31/1      | Kontr. | 1,7       | 0,9 | 11 |
| a-gam     | a-gamm | 1,5       | 0,5 | 10 |
| C40       | Kontr. | 3,2       | 4,0 | 10 |
| C52       | Kontr. | 2,7       | 2,1 | 12 |

Tab. 8 Mittelwerte und Standardabweichungen der Stimulationsindices der Testzellen nach Inkubation mit den Überständen, berechnet für die Kontroll-, die normo- und die dysgammaglobulinämische Tiergruppe

| Tier-<br>gruppe | $\bar{x}$          | s    | n |
|-----------------|--------------------|------|---|
| Kontr.          | 2,33               | 0,67 | 6 |
| Normo           | 2,16 <sup>a)</sup> | 0,33 | 5 |
| Dys             | 1,82 <sup>a)</sup> | 0,64 | 5 |

<sup>a)</sup> nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,33$ )

In einigen Tests wurde auch ein Überstand ausgetestet, der mit PBL von zwei agammaglobulinämischen Tieren gewonnen war. Der Überstand erreichte im Mittel einen Sti-

mulationsindex von 1,5.

Außerdem wurde noch ein Überstand eingesetzt, der mit PBL von einem B15-Tier hergestellt war. Sein Mittelwert bei allen Tests war 2,1 (Tab. 7).

#### 4.4 UM-B19-Tiere als Spender von Testzellen

Ähnlich wie die Lymphozyten von normalen (Kontroll)tieren sprechen Con A-stimulierte PBL der UM-B19-Tiere nicht immer gut auf die IL 2-haltigen Überstände an. Das gilt sowohl für Zellen der normogammaglobulinämischen als auch für die Zellen von dysgammaglobulinämischen Tieren. Dabei scheint kein Zusammenhang zu bestehen zwischen der Höhe der Stimulation der Testzellen mit Con A und ihrer proliferativen Reaktion auf den Überstand (Tab. 9).

Tab. 9 Wirkung von 5 Con A-Überständen auf die Testzellen von UM-B19-Tieren

| Test<br>zellen<br>von | Si mit<br>Con A | Stimulationsindices mit Überstand |      |      |      |      |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|------|------|------|------|
|                       |                 | 15/1                              | 15/2 | 15/3 | 15/4 | 15/5 |
| Normo                 | 13,7            | 1,5                               | 1,5  | 1,7  | 1,1  | 1,2  |
| Normo                 | 6,9             | 0,7                               | 0,6  | 0,5  | 1,2  | 0,6  |
| Normo                 | 3,8             | 1,6                               | 2,7  | 2,3  | /    | /    |
| Dys                   | 5,4             | 2,9                               | 2,6  | 2,7  | 3,3  | 2,5  |
| Dys                   | 1,2             | 0,9                               | 0,9  | 1,0  | 0,9  | 0,7  |
| Dys                   | 2,8             | 0,7                               | 0,5  | 0,6  | /    | /    |

## 4.5

## Absorptionen

Es sollte geprüft werden, ob Con A stimulierte PBL, die den Interleukin 2-Rezeptor exprimieren, die wirksame Komponente aus den Con A-Überständen herausabsorbieren können. Als Kontrolle wurden die Überstände unter gleichen Bedingungen mit nichtstimulierten PBL absorbiert. Die Ergebnisse (Tab. 10) zeigen, daß nur Con A-aktivierte PBL die Aktivität aus den Überständen vollständig herausabsorbieren (Stimulationsindex  $\leq 1$ ). Absorption mit nichtstimulierten PBL bewirkt keine oder nur eine geringfügige Abnahme der Aktivität der Überstände.

Tab. 10 Ergebnisse des Absorptionsversuchs

| Überstand Exp.Nr. |                   |     |
|-------------------|-------------------|-----|
| Nr.               | 1                 | 2   |
| ----- -----       |                   |     |
| C40               | 3,1 <sup>b)</sup> | 3,5 |
| C40a+             | 0,6               | 0,6 |
| C40a-             | 2,3               | 3,3 |
| ----- -----       |                   |     |
| C52               | 6,3               | 2,3 |
| C52a+             | 1,0               | 0,7 |
| C52a-             | 3,8               | 1,6 |
| ----- -----       |                   |     |

a+: Der Überstand wurde mit Con A-stimulierten Zellen inkubiert.

a-: Der Überstand wurde mit nicht stimulierten Zellen inkubiert.

<sup>b)</sup> Stimulationsindex

Bevor der Test für die quantitative Bestimmung von Interleukin 2 etabliert werden konnte, wurden die Bedingungen für die Stimulation von PBL von Hühnern mit Concanavalin A ausgetestet.

In einer Versuchsreihe wurde die zur maximalen proliferativen Reaktion optimale Konzentration des polyklonalen T-Zell-Aktivators Concanavalin A überprüft. Con A wird zur Stimulation von aviären Zellen eingesetzt, weil es auch beim Vogel T-Zell-spezifisch wirkt (Toivanen und Toivanen, 1973). Anders als von Tiemeyer (1986) beschrieben, ergaben sich die höchsten Stimulationsindices meist bei einer Konzentration von 20 µg Con A/ml, bisweilen sogar bei 10 µg/ml. Tiemeyer hatte für Kontrolltiere 50 µg Con A/ml, für normo- und dysgammaglobulinämische Tiere sogar 70 µg/ml als Konzentration, die zur optimalen Stimulation nötig ist, ermittelt. Tatsache ist auch, daß andere Arbeitsgruppen ebenfalls mit wesentlich niedrigeren Con A-Konzentrationen arbeiten, als sie von Tiemeyer ermittelt wurde. So geben z.B. Schnetzler et al. (1983) eine Dosis von 3 µg Con A/ml an. Allerdings stammt ihr Mitogen - wie auch das von Tiemeyer eingesetzte - von einer anderen Firma als das hier verwendete. Die unterschiedliche Herkunft des Mitogens dürfte der Grund sein, weshalb jeweils verschiedene Konzentrationen zur maximalen Stimulation der PBL notwendig waren.

Beim Vergleich der Stimulationsindices fiel auf, daß die Lymphozyten von Tieren der UM-B19-Linie im Mittel niedrigere Proliferationsraten erreichten als die der Kontrolltiere. Aber PBL der dysgammaglobulinämischen Tiere wurden nicht schlechter stimuliert als die Lymphozyten der normogammaglobulinämischen Tiere. Ihr mittlerer Wert liegt im Gegenteil etwas höher.

## 5.2 Aktivität von Interleukin 2

In den meisten Assays für Interleukin 2 wird die proliferative Wirkung dieses Lymphokins auf "responder" Testzellen bestimmt. Gewöhnlich wird die erhöhte Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA der Testzellen gemessen. In den IL 2-Tests werden meistens IL 2-abhängige kontinuierliche Maus-Zelllinien als Testzellen verwendet, was die Variation zwischen den einzelnen Tests minimiert. Der Interleukin 2-Test mit solchen IL 2-abhängigen Zelllinien ist spezifisch, da die Zelllinien nur auf IL 2 reagieren. IL 2-abhängige Maus-Zelllinien können auch im Test mit menschlichem Interleukin 2 eingesetzt werden, da humanes IL 2 ebenfalls die Proliferation dieser Zellen stimuliert (Gillis et al., 1978). Eine Stimulation von Maus-Zelllinien mit Interleukin 2 vom Huhn ist dagegen nicht möglich (Schauenstein et al., 1982), so daß diese Zelllinien als Testzellen für IL 2 vom Huhn nicht zu verwenden sind.

Beim Huhn gab es bisher keine IL 2-abhängigen kontinuierlichen Zelllinien. Deswegen wurden von verschiedenen Forschungsgruppen zur Quantifizierung von IL 2 vom Huhn Con A-stimulierte Hühnerlymphozyten, in denen eine Sub-

population den Rezeptor für Interleukin 2 exprimiert und auf IL 2 mit Proliferation reagiert, verwendet (Schauenstein et al., 1982; Schnetzler et al., 1983, Pink und Vainio, 1983; Krömer et al., 1984).

In der vorliegenden Dissertation wurde auf der Grundlage der existierenden Publikationen ein solcher Test im institutseigenen Labor etabliert.

Einige eigene Beobachtungen bestätigen die in der Literatur beschriebene Spezifität (Schauenstein et al., 1982; Krömer et al., 1984) des verwendeten Tests für Interleukin 2: Die Möglichkeit, daß eine Restwirkung von Con A in den IL 2-haltigen Con A-Überständen die Stimulation der Testzellen verursacht, ist auszuschließen, da alle Überstände mit der gleichen Konzentration von Con A induziert wurden, ihre proliferative Wirkung im IL 2-Test aber sehr unterschiedlich ist.

Einen Hinweis dafür, daß Interleukin 2 das wirksame Prinzip in den Überständen Con A-aktivierter PBL ist, lieferte das Ergebnis zweier Experimente, in denen die Fähigkeit Con A-aktivierter PBL und nichtstimulierter PBL, die aktive Komponente aus den Überständen Con A-aktivierter PBL herauszuabsorbieren, geprüft wurde. Zellen, die den Rezeptor für IL 2 exprimieren, können Interleukin 2 binden und aus dem Überstand herausabsorbieren (Schnetzler et al., 1983; Krömer et al., 1984). Da der IL 2-Rezeptor erst nach einer Aktivierung der Lymphozyten exprimiert wird, dürfte die proliferative Wirkung der Überstände, falls sie durch Interleukin 2 bedingt ist, nur dann ausbleiben, wenn die Überstände mit Con A-aktivierten Lymphozyten absorbiert wurden. Nichtstimulierte Lymphozyten dürften die wirksame Kompo-

nente nicht aus den Überständen herausabsorbieren. Genau dies war auch das Ergebnis der beiden Absorptionsexperimente.

Alle Kulturüberstände wurden unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Gerätschaften, Medium etc. hergestellt, um sicherzugehen, daß Unterschiede in ihrer proliferativen Wirkung nur von physiologischen Unterschieden der PBL abhängen, die zur Herstellung der Con A-Überstände eingesetzt wurden. Der Test für Interleukin 2 ist für das Huhn von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Schauenstein et al., 1982; Pink und Vainio, 1983; Schnetzler et al., 1983). Der von mir verwendete Test wurde im wesentlichen so durchgeführt, wie es von Schauenstein et al. (1982) und Krömer et al. (1984) beschrieben wurde.

Die Überstände bewirkten im Lauf der Testreihe unterschiedliche Proliferationsraten bei den Testzellen. In einigen Test konnte bei keinem der Con A-Überstände eine proliferative Wirkung gemessen werden, auch nicht mit den Überständen, die in anderen Tests sehr gute Stimulation der Testzellen bewirkt haben. Es kann davon ausgegangen werden, daß in diesen wenigen Tests die Testzellen auf das vorhandene Interleukin 2 in den Überständen nicht reagierten. Unterschiede in der Reaktion der Testzellen auf IL 2 sind z.B. auch von Gearing et al. (1985) beschrieben worden.

In den meisten Experimenten konnte eine deutliche Stimulation der Testzellen durch die Con A-Überstände nachgewiesen werden. Allerdings stimulierten nicht alle Überstände die Testzellen in gleichem Ausmaß. Einige Überstände zeigten konstant höhere proliferative Wirkung als

andere. Einer der Überstände war dagegen in fast allen Tests wirkungslos. Solche individuellen Unterschiede in der proliferativen Wirkung - und damit im IL 2-Gehalt - lectin-induzierter PBL-Überstände sind auch von anderen Autoren beschrieben worden (Schauenstein et al., 1982; Gearing et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurden als Testzellen PBL eingesetzt, die 72 Stunden mit Con A stimuliert worden waren. Manche Autoren benutzten für den IL 2-Assay Lymphoblasten, die aus stimulierten PBL auf Percoll isoliert worden waren (Krömer et al., 1984). Ein ähnliches Experiment wurde auch im Rahmen dieser Tests durchgeführt. Die Anzahl von Blasten, die mit Percoll isoliert werden konnten, war allerdings sehr gering. Es konnten nur drei Überstände damit ausgetestet werden. Außerdem haben die so gereinigten Lymphoblasten keine überdurchschnittliche Stimulation gezeigt. Weil sich auch in der Literatur ein Hinweis darauf findet, daß der Einsatz von isolierten Blasten als Testzellen nicht von Vorteil ist (Gearing et al., 1985), wurde in der Folge auf den Einsatz von isolierten Blasten als Testzellen verzichtet.

Insgesamt sind die Stimulationsindices der Testzellen nach Inkubation mit den IL 2-haltigen Überständen in der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit denen, die von anderen Autoren beschrieben wurden. So geben zwar Schauenstein et al. (1982) für zwei ihrer Supernatanz Stimulationsindices von 16 und 18 an, ihre Überstände wurden aber vor dem Test fünf- bis siebenfach konzentriert. Der höchste Index, der im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit einem nicht angereicherten Überstand erzielt

wurde, lag bei 14. Er stellt aber die Ausnahme dar. Meist lagen die Stimulationsindices nicht höher als 3. Bessere Stimulation und damit höhere Stimulationsindices wären wahrscheinlich zu erreichen gewesen, wenn statt PBL Con A-stimulierte Milzzellen zur Produktion von Überständen verwendet worden wären. Schnetzler et al. (1983) und Vainio et al. (1986) zeigten, daß Con A-stimulierte Milzzellen mehr IL 2 produzieren als Con A-aktivierte PBL. Die Tötung von UM-B19-Tiere zum Ansetzen von Milzzellkulturen zur Produktion IL 2-haltiger Überstände kam aber wegen des Mangels an Tieren der UM-B19-Linie nicht in Frage.

Krömer et al. (1984) verwendeten zur Gewinnung der Überstände zwar PBL, setzten aber zur Stimulation nicht Con A sondern einen Con A-Erythrozyten-Komplex ein. Sie weisen in ihrer Arbeit nach, daß damit wesentlich bessere Stimulation der Lymphozyten zu erzielen ist als mit Con A allein. Und auch die Menge von IL 2 in den Kulturüberständen scheint dann höher zu sein.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte auch untersucht werden, ob die dysgammaglobulinämischen Tiere der UM-B19-Linie einen T-Helferzelldefekt haben, der dazu führt, daß ihre Interleukin 2-Produktion deutlich eingeschränkt ist.

Errechnet man Mittelwerte der Stimulationsindices, die mit Con A-Überständen jeder einzelnen Tiergruppe (Kontrolltiere, normo- und dysgammaglobulinämische UM-B19-Tiere) gefunden wurden, so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Wie schon bei den Stimulationsindices nach Stimulation von PBL mit Con A ist auch beim Test der IL 2-haltigen

Überstände nur ein sehr geringer Unterschied zwischen den Indices bei normo-, dysgammaglobulinämischen und Kontrolltieren zu sehen. Unter Einbeziehung aller Experimente zeigten die Überstände von den Kontrolltieren einen mittleren Stimulationsindex von 2,33. Der Stimulationsindex der UM-B19-Tiere liegt mit 1,82 bei den dysgammaglobulinämischen bzw. 2,16 bei den normogammaglobulinämischen Tieren nur wenig darunter. Der Stimulationsindex der dysgammaglobulinämischen Tiere ist nicht signifikant unterschiedlich von dem der normogammaglobulinämischen.

Daraus ist zu schließen, daß die Produktion von Interleukin 2 bei den dysgammaglobulinämischen UM-B19-Tieren sich nicht von der der normogammaglobulinämischen Tiere unterscheidet.

Aber auch wenn die Fähigkeit der dysgammaglobulinämischen UM-B19-Tiere, IL 2 zu produzieren, nicht eingeschränkt zu sein scheint, schließt das nicht aus, daß die Dysgammaglobulinämie auch von einem T-Helferzelldefekt mitverursacht ist. Es käme eine verminderte Produktion anderer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für B-Zellen in Frage. Nachdem aber auch die dysgammaglobulinämischen Tiere der UM-B19-Linie unter gewissen Umständen IgG bilden können, scheint ein solcher Defekt eher unwahrscheinlich.

Die vorliegende Dissertation hatte einerseits die Etablierung eines Tests zur quantitativen Analyse von Interleukin 2 (IL 2) im hiesigen Labor zum Ziel. Zum anderen sollte mit Hilfe dieses Tests untersucht werden, ob es Unterschiede in der Produktion von IL 2 bei dysgammaglobulinämischen UM-B19-Hühnern und normogammaglobulinämischen Tieren derselben Linie gibt. Im Zusammenhang damit schienen auch Unterschiede in der Fähigkeit der Lymphozyten beider Gruppen, auf die Stimulation mit Concanavalin A mit Proliferation zu reagieren, von Interesse zu sein.

Die Experimente lieferten keinen Anhaltspunkt für das Vorliegen von Unterschieden, weder was die Stimulierbarkeit von Blutlymphozyten dys- und normogammaglobulinämischer Tiere mit Con A noch was deren Fähigkeit, Interleukin 2 zu produzieren, angeht.

## Summary

### Analysis of the Interleukin 2-Production in Lymphocytes of UM-B19-Chicken

The object of this dissertation was to establish an assay for quantitative analysis of Interleukin 2 (IL 2) of the chicken.

By means of that test differences in the production of IL 2 between normogammagobulinemic and dysgammaglobulinemic chicken of the UM-B19-line should be explored. Differences in the proliferative reaction of lymphocytes of those chicken incubated with Concanavalin A (Con A) should be analysed either.

Comparison of the results leads to the conclusion that there are no differences - neither in Con A-stimulation nor in IL 2-production - between normogammaglobulinemic and dysgammaglobulinemic chicken of the UM-B19-line.

AARDEN, L.A.

Revised Nomenclature for Antigen-Nonspecific T Cell Proliferation and Helper Factors

J. Immunol. 123, 2928-2929 (1979)

ANDERSSON, J., GRÖNVIK, K.-O., LARSSON, E.-L. und COUTINHO, A.

Studies on T Lymphocyte Activation: 1. Requirements for the Mitogen-Dependent Production of T-Cell Growth Factors

Eur. J. Immunol. 9, 581-587 (1979)

BACH, F.H., SEGALL, M., ZIER, K.S., SONDEL, P.M. und ALTER, B.J.

Cell Mediated Immunity: Separation of Cells Involved in Recognitive and Destructive Phases

Science 180, 403-406 (1973)

BIDDISON, W.E., SHARROW, S.O. und SHEARER, G.M.

T Cell Subpopulations Required for the Human Cytotoxic T Lymphocyte Response to Influenza Virus: Evidence for T Cell Help

J. Immunol. 127, 487-491 (1981)

BONNARD, G.D., YASAKA, K. und JACOBSON, D.

Ligand-Activated T Cell Growth Factor-Induced Proliferation: Absorption of T Cell Growth Factor by Activated T Cells

J. Immunol. 123, 2704-2708 (1979)

BROWN, W.C.

Biological and Biochemical Characterization of Bovine IL-2. Studies with Cloned Bovine T-Cells.

J. Immunol. 133, 3184-3190 (1985)

BRÜGGEMANN, J., MERKENSCHLAGER, M., KIRCHNER, B. und LÖSCH, U.

Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn

Naturwissenschaften 54, 1-2 (1967)

CANTOR, H. und BOYSE, E.A.  
Functional Subclasses of T Lymphocytes Bearing Different  
Ly Antigens. 2. Cooperation between Subclasses of Ly+  
Cells in the Generation of Killer Activity  
J. Exp. Med. 141, 1390-1399 (1975)

CANTOR, H. und BOYSE, E.A.  
Regulation of Cellular and Humoral Immune Response by T-  
Cell Subclasses  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23-32 (1977)

CANTOR, H. und SIMPSON, E.  
Regulation of the Immune Response by Subclasses of T  
Lymphocytes. 1. Interactions between Prekiller T Cells  
and Regulatory T Cells Obtained from Peripheral Lymphoid  
Tissues of Mice  
Eur. J. Immunol. 5, 330-336 (1975)

CAPLAN, B., GIBBS, C. und PAETKAU, V.  
Properties of Sodium Dodecyl Sulfate-Denatured Interleu-  
kin 2  
J. Immunol. 126, 1351-1354 (1981)

CLAMAN, H.N., CHAPERON, E.A. und TRIPLETT, R.F.  
Thymus-Marrow Cell Combinations. Synergism in Antibody  
Production  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1167-1171 (1966)

CHEN, D.M. und DISABATO, G.  
Further Studies on the Thymocyte Stimulating Factor  
Cell. Immunol. 22, 211-224 (1976)

COUTINHO, A., LARSSON, E.-L., GRÖNVIK, K.-O. und  
ANDERSSON, J.  
Studies on T Lymphocyte Activation: 2. The Target Cells  
for Concanavalin A-Induced Growth Factors  
Eur. J. Immunol. 9, 587-592 (1979)

DISABATO, G.  
Purification and Initial Characterization of Rat Inter-  
leukin 2  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3020-3023 (1982)

DUTTON, R.W., FALKOFFER, R., HIRST, J.A., HOFFMAN, M., KAPPLER, J.W., KETTMAN, J.R. LESLEY, J.F. und VANN, D.  
Is there Evidence for a Non-Antigen-Specific Diffusable Chemical Mediator from the Thymus-Derived Cell in the Initiation of the Immune Response?  
Prog. Immunol. 1, 355-368 (1971)

ESKOLA, J. und TOIVANEN, A.  
Cell Transplantation into Immunodeficient Chicken Embryos. Reconstitution Capacity of Cells from the Bursa of Fabricius, Spleen, Bone Marrow, Thymus and Liver of 18-Day-Old Embryos.  
Cell. Immunol. 26, 68-77 (1976)

EVANS, G.H. und INVANYI, J.  
In vitro Response of Chicken Spleen Cells to Sheep Red Blood Cells  
Cell. Immunol. 14, 402-410 (1974)

FARR, A.G., DORF, M.E. und UNANUE, E.R.  
Secretion of Mediators Following T Lymphocyte-Macrophage Interaction Is Regulated by the Major Histocompatibility Complex  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3542-3546 (1977)

FARRAR, J.J., BENJAMIN, W.R., CHENG, L. und PAWSON, B.A.  
Interleukin 2  
Annu. Med. Rep. Chem. 19, 191-200 (1984)

FARRAR, J.J., BENJAMIN, W.R., HILFIKER, M.L., HOWARD, M., FARRAR, W.L. und FULLER-FARRAR, J.  
The Biochemistry, Biology and Role of Interleukin 2 in the Induction of Cytolytic T Cell and Antibody-Forming B Cell Response  
Immunol. Rev. 63, 129-166 (1982)

FIEDLER, H., LÖSCH, U. und HALA, K.  
Establishment of a B-Compatible Chicken Line with Normo-gammaglobulinemia and Dysgammaglobulinemia (IgM/IgG).  
Fol. Biol. (Praha) 26, 17-25 (1980)

FLEISCHER, B.  
Effector Cells in Avian Spontaneous and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity  
J. Immunol. 125, 1161-1165 (1980)

- FRIEDMANN, S.M., HUNTER, S.B., IRIGOYEN, O.H., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G. und CHESS, L.  
Functional Analysis of Human T Cell Subsets Defined by Monoclonal Antibodies. 6. Collaborative T-T Interactions in the Generation of TNP-Altered Self-Reactive Cytotoxic T Lymphocytes  
J. Immunol. 126, 1702-1708 (1981)
- GEARING, A.J.H., JOHNSTONE, A.P. und THORPE, R.  
Production and Assay of the Interleukins  
J. Immunol. Meth. 83, 1-27 (1985)
- GILLIS, S., FERM, M.M., OU, W. und SMITH, K.A.  
T-Cell Growth Factor: Parameters of Production and Quantitative Microassay for Activity  
J. Immunol. 120, 2027-2032 (1978)
- GILLIS, S., MOCHIZUKI, D.Y., CONLON, P.J., HEFENEIDER, S.H., RAMTHUN, C.A., GILLIS, A.E., FRANK, M.B., HENNEY, C.S. und WATSON, J.D.  
Molecular Characterization of Interleukin 2  
Immunol. Rev. 63, 167-209 (1982)
- GILLIS, S., SCHEID, M. und WATSON, J.  
Biochemical and Biologic Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules. 3. The Isolation and Phenotypic Characterization of IL 2-Producing T Cell Lymphomas  
J. Immunol. 125, 2570-2578 (1980)
- GILLIS, S. und WATSON, J.  
Biochemical and Biological Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules. 5. Identification of an Interleukin 2-Producing Human Leukaemia T Cell Line  
J. Exp. Med. 152, 1709-1719 (1980)
- GREENE, W.C. und ROBB, R.J.  
Receptors for T-Cell Growth Factor: Structure, Function and Expression on Normal and Neoplastic Cells  
Cont. Top. Mol. Immunol. 10, 1-34 (1985)
- GRÖNVICK, K.O. und ANDERSSON, J.  
The Role of T Cell Growth Stimulating Factors in T Cell Triggering  
Immunol. Rev. 51, 35-59 (1980)

GRONDEL, J.L. und HARMSSEN, E.G.M.  
Phylogeny of Interleukins: Growth Factors Produced by  
Leucocytes of the Cyprinid Fish, *Cyprinus Carpio* L.  
*Immunology* 52, 477-482 (1984)

HAYARI, Y., SCHAUENSTEIN, K. und GLOBERSON, A.  
Avian Lymphokines II: Interleukine 1 Activity in Super-  
natants of Stimulated Adherent Splenocytes of Chicken  
*Dev. Comp. Immunol.* 6, 785-789 (1982)

HERLYN, D., BOHNER, J. und LÖSCH, U.  
IgG Turnover in Dysgammaglobulinaemic Chickens  
Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 358, 1169-1172 (1977)

KIRCHNER, H. und BLAESE, R.M.  
Pokeweed Mitogen-, Concanavalin A- and Phytohem-  
agglutinin-Induced Development of Cytotoxic Effector  
Lymphocytes  
*J. Exp. Med.* 138; 812-824 (1973)

KRISTENSEN, F., WALKER, C. und DE WECK, A.  
Effects of Interleukin 2 on the Cell Cycle of Murine  
Thymocytes  
*Immunobiology* 159, 58 (1981)

KRÖMER, G., SCHAUENSTEIN, K. und WICK, G.  
Avian lymphokines: an Improved Method for Chicken IL-2  
Production and Assay. A Con A-Erythrocyte Complex Induces  
Higher T Cell Proliferation and IL-2 Production than  
does Free Mitogen  
*J. Immunol. Meth.* 73, 273-281 (1984)

KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., REINHERZ, E.L. und  
SCHLOSSMAN, S.F.  
Monoclonal Antibodies Defining Distinctive Human T Cell  
Surface Antigens  
*Science* 206, 347-349 (1979)

LARSSON, E.L.  
Mechanism of T Cell Activation. II. Antigen- and Lectin-  
Dependent Acquisition of Responsiveness to TCGF Is a  
Nonmitogenic, Active Response of Resting T Cells  
*J. Immunol.* 126, 1323-1326 (1981)

LARSSON, E.L. und COUTINHO, A.  
Mechanism of T Cell Activation. 1. A Screening of "Step  
One" Ligands  
*Eur. J. Immunol.* 10, 93-99 (1980)

- LARSSON, E.L., ISCOVE, N.N. und COUTINHO, A.  
Two Distinct Factors Are Required for the Induction of T  
Cell Growth  
Nature 283, 664-666 (1980)
- LÖSCH, U.  
Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobu-  
linämie  
Habilitationsschrift, Universität München (1972)
- LÖSCH, U., HARTMANN, W. und RIEDEL, G.  
Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer  
Hühner. II. Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA)  
Z. Immun. Forsch. 143, 16-30 (1972)
- LÖSCH, U. und HOFFMANN-FEZER, G.  
Vergleichende histologische und immunologische Untersu-  
chungen an immunologisch defekten Hühnern. II. Genuin  
dysgammaglobulinämische Hühner  
Zentbl. Vet. Med. A. 20, 596-605 (1973)
- LÖSCH, U., KÜHLMANN, I., KLUMPNER, W. und FIEDLER, H.  
Course of Serum-Ig Concentration in B12 Chicken of the  
UM Line  
Immunbiol. 158, 416-425 (1981)
- LÖSCH, U., WANKE, R. und MERKENSCHLAGER, M.  
Antikörper-Isotypen nach Immunisierung genuin dysgamma-  
globulinämischer UM-B19 Hühner  
Zentbl. Vet. Med. A. 29, 365-374 (1982)
- MERTELSMANN, R.  
Interleukin 2. Physiologie, Pathophysiologie und klini-  
sche Möglichkeiten  
Münch. Med. Wschr. 128, 259-261 (1986)
- MITCHELL, G.F. und MILLER, J.F.A.P.  
Cell to Cell Interactions in the Immune Response. 2. The  
Source of Hemolysin-Forming Cells in Irradiated Mice Gi-  
ven Bone Marrow and Thymus or Thoracic Duct Lymphocytes  
J. Exp. Med. 128, 821-837 (1968)
- MORGAN, D.A., RUSCETTI, F.W. und GALLO, R.C.  
Selective in vitro Growth of T Lymphocytes from Normal  
Human Bone Marrows  
Science 193, 1007-1008 (1976)

PAETKAU, V., BLEACKLEY, R.C., RIENDEAU, D., HARNISH, D.G. und HOLOWACHUK, E.W.

Toward the Molecular Biology of IL-2  
Contemp. Top. Mol. Immunol. 10, 35-61 (1985)

PAETKAU, V., MILLS, G., GERHART, S. und MONTICONE, V.  
Proliferation of Murine Thymic Lymphocytes in vitro Is Mediated by the Concanavalin A-Induced Release of a Lymphokine (Costimulator)

J. Immunol. 117, 1320-1324 (1976)

PAETKAU, V., SHAW, J., MILLS, G. und CAPLAN, B.  
Cellular Origins and Targets of Costimulator (IL2)  
Immunol. Rev. 51, 157-175 (1980)

PFIZENMAIER, K., DELZEIT, R., RÖLLINGHOFF, M. und WAGNER, H.

T-T Cell Interactions during in vitro Cytotoxic T Lymphocytes Responses. III. Antigen-Specific T Helper Cells Release Nonspecific Mediator(s) Able to Help Induction of H-2-Restricted Cytotoxic T Lymphocyte Responses across Cell Impermeable Membranes.

Eur. J. Immunol. 10, 577-582 (1980)

PINK, J.R. und MIGGIANO, V.C.  
Complementation between Genetic Variants Affecting the Response of Chicken Leucocytes to Concanavalin A  
J. Immunol. 119, 1796-1799 (1977)

PINK, J.R.L. und VAINIO, O.  
Genetic Control of the Response of Chicken T Lymphocytes to Concanavalin A: Cellular Localization of the Low Responder Defect  
Eur. J. Immunol. 13, 571-575 (1983)

PRINCZ, W.  
Versuche zur Rekonstruktion immundefizienter UM-B19 Hühner durch Zelltransfer  
Dissertation, Universität München (1984)

RABIN, H., HOPKINS, F.W., RUSCETTI, F.W., NEUBAUER, R.H., BROWN, R.L. und KAWAKAMI, T.G.  
Spontaneous Release of a Factor with Properties of T Cell Growth Factor from a Continuous Line of Primate Tumor Cells  
J. Immunol. 127, 1852-1855 (1981)

- ROBB, R.J., MUNCK, A. und SMITH, K.A.  
T Cell Growth Factor Receptors. Quantitation, Specificity  
and Biological Relevance.  
J. Exp. Med 154, 1455-1474 (1981)
- ROBB, R.J. und SMITH, K.A.  
Heterogeneity of Human T-Cell Growth Factor Due to Gly-  
cosylation  
Mol. Immunol. 18, 1087-1094 (1981)
- RUSCETTI, F.W., MORGAN, D.A. und GALLO, R.C.  
Functional and Morphologic Characterization of Human T  
Cells Continuously Grown in vitro  
J. Immunol. 119, 131-138 (1977)
- SCHAUENSTEIN, K., GLOBERSON, A. und WICK, G.  
Avian lymphokines: 1. Thymic Cell Growth Factor in Su-  
pernatants of Mitogen Stimulated Chicken Spleen Cells.  
Dev. Comp. Immunol. 6, 533-540 (1982)
- SCHIMPL, A. und WECKER, E.  
Replacement of T Cell Function by a T Cell Product  
Nature 237, 15 (1972)
- SCHNETZLER, M., OOMMEN, A. und NOWAK, J.S.  
Characterization of Chicken T-Cell Growth Factor  
Eur. J. Immunol. 13, 560-566 (1983)
- SHAW, J., MONTICONE, V., MILLS, G. und PAETKAU, V.  
Effects of Costimulator on Immune Responses in vitro  
J. Immunol. 120, 1974-1980 (1978)
- SMITH, K.A.  
T Cell Growth Factor  
Immunol. Rev. 51, 337-357 (1980)
- SMITH, K.A.  
Interleukin 2  
Ann. Rev. Immunol. 2, 319-333 (1984)
- SMITH, K.A., GILLIS, S., BAKER, P.E., McKENZIE, D. und  
RUSCETTI, F.W.  
T-Cell Growth Factor Mediated T-Cell Proliferation  
Ann. NY Acad. Sci. 332, 423-432 (1979)

SOLBACH, W., RÖLLINGHOFF, M. und WAGNER, H.  
Die Rolle von Interleukin-2 bei der Aktivierung von cy-  
totoxischen T-Lymphozyten  
Klin. Wochenschrift 61, 67-75 (1983)

TANIGUCHI, T., MATSUI, H., FUJITA, T., TAKAOKA, C.,  
KASHIMA, N., YOSHIMOTO, R. und HAMURO, J.  
Structure and Expression of a Cloned cDNA for Human  
Interleukin-2  
Nature 302, 305-310 (1983)

TIEMEYER, D.  
Zur weiteren Charakterisierung einer aviären Dysgamma-  
globulinämie  
Dissertation, Universität München (1986)

TOIVANEN, P. und TOIVANEN, A.  
Selective Activation of Chicken T Lymphocytes by Conca-  
navalin A  
J. Immunol. 111, 1602-1603 (1973)

VAINIO, O., RATCLIFFE, M.J.H. und LEANDERSON, T.  
Chicken T-Cell Growth Factor: Use in the Generation of a  
Long-Term Cultured T-Cell Line and Biochemical Character-  
ization  
Scand. J. Immunol. 23, 135-142 (1986)

WAGNER, H., RÖLLINGHOFF, M. und NOSSAL, G.J.V.  
T-Cell-Mediated Immune Responses Induced in vitro: A  
Probe for Allograft and Tumor Immunity  
Transplant. Rev. 17, 3-36 (1973)

WAGNER, H. und RÖLLINGHOFF, M.  
T-T-Cell Interactions during in vitro Cytotoxic Allo-  
graft Responses. 1. Soluble Products from Activated Ly  
1+ T Cells Trigger Autonomously Antigen-Primed Ly 23+  
T Cells to Cell Proliferation and Cytolytic Activity  
J. Exp. Med. 148, 1523-1538 (1978)

WAGNER, H. und RÖLLINGHOFF, M.  
Interleukin 2  
Behring Inst. Mitt. 67 (1980)

WATSON, J., FRANK, M.B., MOCHIZUKI, D. und GILLIS, S.  
The Biochemistry and Biology of Interleukin-2  
Lymphokines 6, 95-116 (1982)

WATSON, J., GILLIS, S., MARBROOK, J., MOCHIZUKI, D. und SMITH, K.A.

Biochemical and Biological Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules. 1. Purification of a Class of Murine Lymphokines

J. Exp. Med. 150, 849-861 (1979)

WATSON, J. und MOCHIZUKI, D.

Interleukin 2: A Class of T Cell Growth Factors

Immunol. Rev. 51, 257-278 (1980)

YOKOTA, T., ARAI, N., LEE, F., RENNICK, D., MOSMANN, T. und ARAI, K.-I.

Use of a cDNA Expression Vector for Isolation of Mouse Interleukin 2 cDNA Clones: Expression of T-Cell Growth-Factor Activity after Transfection of Monkey Cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 68-72 (1985)



Herrn Prof. Dr. Lösch möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas, aber auch für die jederzeit gewährte Unterstützung bei allen fachlichen und sonstigen Schwierigkeiten.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Cihak für seine fachliche Beratung und den großen Einsatz, mit dem er diese Arbeit betreut hat.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts, allen voran Frau Mantel, für ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit und ihre immerwährende Freundlichkeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Metzler und seinen Mitarbeitern der Bibliothek der Fa. Boehringer Mannheim in Tutzing, die mir die große Auswahl an Fachliteratur zugänglich gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. Zucker und Herrn Prof. Dr. Merkschlagger danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut.

Ich danke meiner Familie, ohne deren geduldige Hilfe und Zuspruch die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## **LEBENS LAUF**

|                    |                                                                                                                                                                        |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| geboren            | am 6. Dezember 1959 in Haag/Wasserburg am Inn                                                                                                                          |
| Eltern             | Dipl.Ing. Hermann Edelmann und<br>Dr.med. Margarethe Edelmann, geb. Beeh                                                                                               |
| Schulen            | 1966-1970 Grundschule in Geretsried<br>1970-1972 Gymnasium in Geretsried<br>1972-1979 Neusprachliches Gymnasium in Tutzing                                             |
| Abitur             | 27. Juni 1979                                                                                                                                                          |
| Universität        | von November 1979 bis August 1985<br>Studium an der Tierärztlichen Fakultät<br>der Ludwig-Maximilians-Universität,<br>München                                          |
| Examen             | 20. August 1985                                                                                                                                                        |
| November 1985      | Beginn der vorliegenden Dissertation im<br>Institut für Physiologie, Physiologische<br>Chemie und Ernährungsphysiologie der<br>Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| 21. November 1980  | Heirat mit Dipl.Ing. Rudolf Fischets-<br>rieder                                                                                                                        |
| 19. Januar 1981    | Geburt von Sohn Ferdinand                                                                                                                                              |
| 16. September 1986 | Geburt von Tochter Veronika                                                                                                                                            |









